

Aus der Klinik für Urologie und Kinderurologie  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Rainer Hofmann

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Titel der Dissertation:

Expression des Suppressors zytokiner Signalübertragung 3 (SOCS3) in humanem  
klarzelligem Nierenzellkarzinom versus normalem Nierengewebe

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin  
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

Svenja Rebecca Stumpf aus Kehl am Rhein  
Marburg, 2017

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
am: 16.08.2017

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Herr Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: Frau PD Dr. A. Urbschat

1. Korreferent: Herr Prof. Dr. T. Wündisch

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b>	<b>6</b>
1.1 Das Nierenzellkarzinom	6
1.1.1 Definition und Epidemiologie	6
1.1.2 Genese	6
1.1.3 Histopathologie und Einteilung	7
1.1.4 Klinik	10
1.1.4.1 Klinische Symptomatik des Nierenzellkarzinoms	10
1.1.4.2 Paraneoplastische Symptome beim Nierenzellkarzinom	11
1.1.4.3 Metastasierung	12
1.1.5 Diagnostik	12
1.1.6 Therapie	14
1.1.6.1 Therapie des lokal begrenzten Nierenzellkarzinoms	14
1.1.6.2 Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms	16
1.1.7 Prognose	17
1.2 Einfluss des Immunsystems auf die Tumorentstehung	20
1.3 Signal transducer and activator of transcription-3 (STAT3)	21
1.3.1 STAT3 Struktur und Funktion	21
1.3.2 Der JAK-STAT-Signalweg	22
1.3.3 STAT3 in Tumorgewebe	24
1.3.4 STAT3 im Nierenzellkarzinom	25
1.4 Suppressor of cytokine signaling-Proteine (SOCS)	26
1.4.1 SOCS-Proteine	26
1.4.2 SOCS3 Struktur und Funktion	26
1.4.3 SOCS3 in Tumorgewebe	27
1.4.4 SOCS3 in Nierengewebe und im Nierenzellkarzinom	28
1.5 Zielsetzung der Arbeit	29
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>30</b>
2.1 Reagenzien und Chemikalien	30
2.2 Gewebeprobe	32
2.3 Kultur der Caki-1-Zellen	34
2.4 RNA-Analytik	36

2.4.1 Isolierung von RNA aus den Gewebeproben	36
2.4.2 Isolierung von RNA aus der Zellkultur	37
2.4.3 DNase-Verdau und Phenolextraktion	37
2.4.4 RNA-Gelelektrophorese	38
2.4.5 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	39
2.4.5.1 Allgemeine Grundlagen der RT-PCR	39
2.4.5.2 Transkription der RNA zu cDNA	41
2.4.6 Realtime TaqMan-Polymerase-Kettenreaktion (TaqMan-PCR)	41
zur Analyse von SOCS3, IL-6, CA-IX	
2.4.6.1 Grundlagen der Realtime TaqMan-PCR	41
2.4.6.2 Durchführung der Realtime TaqMan-PCR	43
2.5 Proteinanalytik	44
2.5.1 Isolierung von Proteinextrakten aus den Gewebeproben	44
2.5.2 Isolierung von Proteinextrakten aus der Zellkultur	45
2.5.3 Bestimmung der Proteinkonzentration	45
2.5.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	45
2.5.5 Western-Blot-Analyse zur Bestimmung der Proteine SOCS3, β-Tubulin, pSTAT3 und tSTAT3	48
2.6 Immunohistochemie zur histomorphologischen Darstellung von SOCS3	51
2.6.1 Anfertigung der Gewebeschnitte	51
2.6.2 Durchführung	51
2.7 Zellkulturversuche	53
2.7.1 Zellstimulationsversuch mit Caki-1-Zellen und Messung von SOCS3 mittels Realtime TaqMan-PCR	53
2.8 Statistik	54
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>55</b>
3.1 RNA-Gelelektrophorese	55
3.2 Genexpression der Carboanhydrase-IX (CA-IX) signifikant erhöht im Nierenzellkarzinomgewebe	55
3.3 Genexpression von IL-6 signifikant erhöht im Nierenzellkarzinomgewebe	56
3.4 Die SOCS3-Genexpression im Nierenzellkarzinomgewebe und Normalgewebe	57
3.5 Die SOCS3-Proteinexpression im Nierenzellkarzinomgewebe und Normalgewebe	59

3.6 Die Proteinexpression von pSTAT3 und tSTAT3 im Nierenzellkarzinomgewebe und Normalgewebe	61
3.7 Immunohistochemische Darstellung von SOCS3 im Nierenzellkarzinomgewebe und Normalgewebe	62
3.8 Unterschiede in der SOCS3-Genexpression zwischen Tumor- und Normalgewebe persistieren im Hinblick auf die TNM-Stadien und den Grad	64
3.9 Induktion der SOCS3-Genexpression durch IFN- $\gamma$ in Caki-1-Zellen	66
<b>4 Diskussion</b>	<b>67</b>
4.1 Die Rolle von SOCS3 im klarzelligen Nierenzellkarzinom	67
4.2 Die Expression von IL-6 und CA-IX im klarzelligen Nierenzellkarzinom	72
4.3 IFN- $\gamma$ induziert die SOCS3-Expression in einer Nierenzellkarzinom-Zelllinie	75
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>78</b>
<b>6 Summary</b>	<b>79</b>
<b>7 Literaturverzeichnis</b>	<b>80</b>
<b>8 Anhang</b>	<b>91</b>
8.1 Verzeichnis der akademischen Lehrer	91
8.2 Förderung und Danksagung	92

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Nierenzellkarzinom

### 1.1.1 Definition und Epidemiologie

Krebserkrankungen gehören zu den häufigsten Todesursachen in der heutigen Zeit. Aus Statistiken von 2009 geht hervor, dass in den USA Krebserkrankungen, nach Herz-Kreislaufkrankungen, die zweithäufigste Todesursache darstellen, unabhängig von Alter und Geschlecht. Zwischen dem 40. und 79. Lebensjahr stehen sie an erster Stelle der Todesursachenstatistik (Siegel, Naishadham et al. 2013).

Das Nierenzellkarzinom ist eine maligne Erkrankung der Niere und hat einen Anteil von 2 bis 3 % unter allen Krebserkrankungen. Es tritt mit einer Inzidenz von 10/100.000 Einwohnern auf, Männer sind doppelt so häufig betroffen wie Frauen. Der Häufigkeitsgipfel liegt zwischen dem 60. und 70. Lebensjahr. Es handelt sich dabei meist um eine sporadisch auftretende Erkrankung neben hereditären Formen, z.B. dem von-Hippel-Lindau-Syndrom, bei dem neben anderen Tumoren oft Nierenzellkarzinome entstehen (Ljungberg, Bensalah et al. 2015, Kobayashi, Takahashi et al. 2016).

In Europa traten 2012 84.400 neue Nierenzellkarzinomfälle und 34.700 Todesfälle auf (Ljungberg, Bensalah et al. 2015). Laut Auswertungen aus den USA traten im Jahr 2013 65.150 Neuerkrankungen auf, davon 40.430 bei Männern und 24.720 bei Frauen (Siegel, Naishadham et al. 2013). Die Nierentumore liegen bei Männern mit 5 % auf Platz 6 aller neuen Krebserkrankungen, bei Frauen mit 3 % auf Platz 8. In den USA kam es zu einer Zunahme der Inzidenz des Nierenzellkarzinoms von 10,6/100.000 im Jahr 2001 auf 12,4/100.000 im Jahr 2010, vor allem bei jüngeren Patienten im Alter von 20-24 Jahren (King, Pollack et al. 2014). Weltweit gibt es jährlich 270.000 Neuerkrankungen und 116.000 Todesfälle durch das Nierenzellkarzinom (Chang, Moniz et al. 2015). Das Nierenzellkarzinom stellt damit eine relevante maligne Erkrankung dar, deren Häufigkeit zunimmt.

### 1.1.2 Genese

Die Ätiologie des Nierenzellkarzinoms ist nicht genau bekannt. Es sind jedoch verschiedene Risikofaktoren belegt, die die Entstehung dieses Karzinoms begünstigen.

Zu den Hauptrisikofaktoren zählen Nikotinabusus, Adipositas und arterielle Hypertonie (Lipworth, Tarone et al. 2006). Zudem besteht ein erhöhtes Risiko an einem Nierenzellkarzinom zu erkranken für Verwandte 1. Grades von bereits erkrankten Personen (Clague, Lin et al. 2009).

In einer prospektiven Kohortenstudie über einen mittleren Beobachtungszeitraum von 8 Jahren zeigte sich, dass Rauchen, insbesondere ab einer Nikotinbelastung von 35,5 pack years, im Vergleich zu Nichtrauchern ein wesentlicher Risikofaktor darstellt. Des Weiteren wurde Adipositas mit einem BMI > 35 kg/m<sup>2</sup> gegenüber einem BMI < 25 kg/m<sup>2</sup> als Risikofaktor identifiziert. Zudem wurden Nierenerkrankungen im Allgemeinen wie die chronische terminale Niereninsuffizienz als Risikofaktoren zur Entstehung eines Nierenzellkarzinoms genannt (Macleod, Hotaling et al. 2013). Viele weitere Faktoren wie die Analgetika-Nephropathie durch Einnahme von nicht-steroidalen Antirheumatika, erworbene Nierenzysten bei dialysepflichtigen Patienten, Schadstoffbelastung durch Cadmium, Trichlorethen oder Arsen, werden in der Literatur ebenfalls genannt. Hingegen konnte kein Zusammenhang zu dem Konsum von Alkohol, dem Verzehr von Obst oder vegetarischer Ernährung gezeigt werden. In einigen Arbeiten wird sogar ein protektiver Effekt von Alkohol beschrieben, wobei die Mechanismen im Detail nicht bekannt sind (Song, Song et al. 2012, Ljungberg, Bensalah et al. 2015).

Weiterhin kommt das Nierenzellkarzinom im Zusammenhang mit anderen Erkrankungen gehäuft vor. Dazu gehören unter anderem das von-Hippel-Lindau-Syndrom und die tuberöse Sklerose.

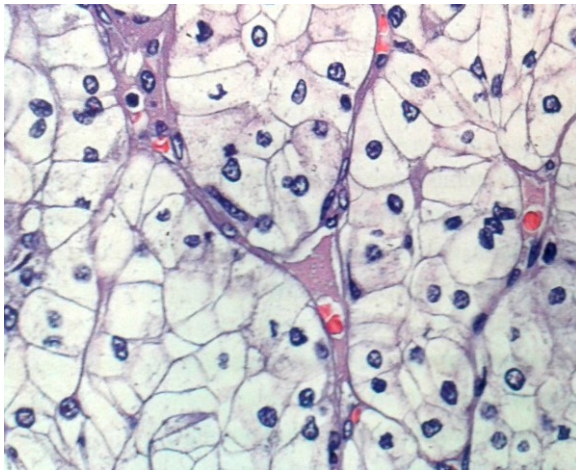
### 1.1.3 Histopathologie und Einteilung

In der Niere treten gutartige (benigne) und bösartige (maligne) Tumore auf. Zu den gutartigen Tumoren gehören Adenome, die aus Epithelzellen hervorgehen und in Adenokarzinome übergehen können, sowie Onkozytome, die ebenso epithelialen Ursprungs sind.

Das Nierenzellkarzinom ist häufig von einer Pseudokapsel aus Bindegewebe umgeben. Es zeigt hellgelbe bis gräuliche Gewebeareale im Wechsel mit Nekrosen, Einblutungen und Zysten.

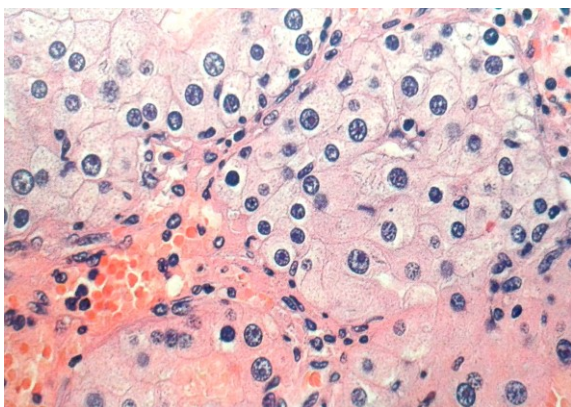
Es wird weiter in verschiedene histologische Typen differenziert. Das klarzellige Nierenzellkarzinom bildet mit 80 bis 90 % aller Nierenzellkarzinome den größten Anteil, gefolgt vom papillären Karzinom mit ca. 10 % (Patard, Leray et al. 2005).

Das klarzellige Nierenzellkarzinom geht aus Zellen des proximalen Tubulus hervor und zeigt mikroskopisch deutliche Zellgrenzen und ein helles Zytoplasma (Thoenes, Storkel et al. 1986). Das papilläre Nierenzellkarzinom geht ebenso aus Zellen des proximalen Tubulus hervor. Das Tumorgewebe bildet Papillen aus, die namensgebend sind. Es ist dem papillären Adenom sehr ähnlich, welches sich jedoch durch eine Größe von < 0,5 cm definiert. Zu den selteneren histologischen Typen gehört das chromophobe Karzinom, das sich durch eosinophiles Zytoplasma mit perinukleärer Aufhellung auszeichnet und aus dem distalen Tubulussystem hervorgeht, sowie das Ductus-Bellini-Karzinom, das aus Zellen der Sammelrohre entsteht. Darüber hinaus gibt es noch sehr

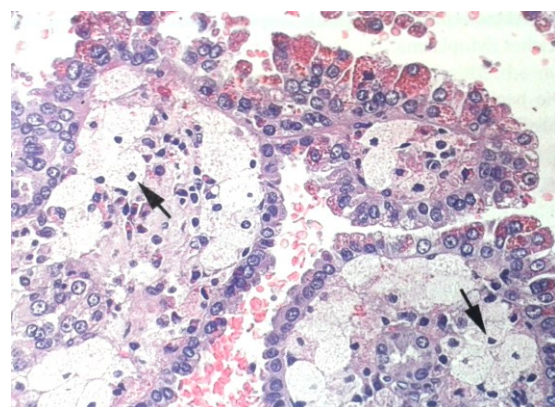


klarzelliges Nierenzellkarzinom

seltene, teilweise neue Tumorentitäten. Dazu zählen mesenchymale Tumore, spindelzellige Karzinome, Epithel-Stroma-Tumore oder Translokationstumore. Letztere sind besonders bei Kindern und jungen Erwachsenen zu finden (Renz-Polster and Krautzig 2008, Böcker, Denk et al. 2012).



chromophobes Nierenzellkarzinom



papilläres Nierenzellkarzinom

**Abb. 1.1.3.1: Histologie verschiedener Nierenzellkarzinome.** Die Abbildungen zeigen lichtmikroskopische Ausschnitte aus verschiedenen Nierenzellkarzinomen in der H.E.-Färbung. Typisch für das klarzellige Nierenzellkarzinom (oberes Bild) ist das aufgelockerte, helle Zytoplasma. (Bildnachweis in: Böcker, Denk et al. (Hrsg.): Pathologie, 5. Auflage, München 2012, S. 717-718).



Das Nierenzellkarzinom wird wie andere Tumorerkrankungen nach der TNM-Klassifikation eingeteilt, entsprechend den Europäischen Leitlinien der Urologie (Ljungberg, Bensalah et al. 2015). Dies beinhaltet die lokale Tumorausbreitung (T), die Lymphknotenmetastasierung (N) und die Fernmetastasierung (M). T, N und M werden zusammengefasst in die Stadien I-IV nach UICC (Union contre le cancer, 2010). Des Weiteren erfolgt die Einteilung nach der Entdifferenzierung der Zellen, dem sogenannten Grad nach Fuhrman (Fuhrman, Lasky et al. 1982).

#### TNM – Klassifikation :

- T0     kein Primärtumor nachweisbar
  
- T1     Tumor bis 7 cm, auf die Niere begrenzt
  - T1a     < 4 cm
  - T1b     4 – 7 cm
  
- T2     Tumor > 7 cm, auf die Niere begrenzt
  - T2a     7 – 10 cm
  - T2b     Tumor > 10 cm
  
- T3     Tumor breitet sich auf große Gefäße und perirenales Gewebe aus, jedoch nicht außerhalb der Gerota-Faszie
  - T3a     Invasion in Nierenvene oder perirenale Infiltration
  - T3b     Invasion Vena cava unterhalb des Zwerchfells
  - T3c     Invasion Vena cava oberhalb des Zwerchfells
  
- T4     Durchbruch der Gerota-Faszie, Ausdehnung auf die ipsilaterale Nebenniere
  
- N0     Keine Lymphknotenmetastasen
- N1     Metastase in 1 regionären Lymphknoten
- N2     Metastasen in mehr als 1 Lymphknoten
  
- M0     keine Fernmetastasen
- M1     Nachweis von Fernmetastasen

### Stadieneinteilung (UICC, 2010):

Stadium I     T1 N0 M0

Stadium II    T2 N0 M0

Stadium III   T3 N0 oder T1 – T3 N1 M0

Stadium IV   T4 N0, N1 M0 oder jedes T N2 M0 oder jedes T, jedes N M1

### Grade nach Fuhrman:

G1     gut differenziert

G2     mäßig differenziert

G3     schlecht differenziert

G4     undifferenziert

#### 1.1.4 Klinik

##### 1.1.4.1 Klinische Symptomatik des Nierenzellkarzinoms

Bis zu 70 % der Nierenzellkarzinome sind sonographische Zufallsbefunde bei asymptomatischen Patienten, die aus einem anderen Grund eine Ultraschall- oder CT-Untersuchung des Bauchraumes erhalten (Tsui, Shvarts et al. 2000). Es existieren keine typischen Frühsymptome, sodass die ersten Symptome oft erst in fortgeschrittenen Stadien auftreten. Das Leitsymptom ist eine Makrohämaturie, gefolgt von Flankenschmerzen und seltener einem tastbaren Tumor. Die typische Trias aus diesen drei Symptomen findet sich nur bei 6 bis 10 % der Patienten und ist häufig mit einer aggressiven Histologie oder einer fortgeschrittenen Erkrankung assoziiert (Lee, Katz et al. 2002, Patard, Leray et al. 2003). Es können B-Symptome auftreten, bestehend aus unklar erhöhter Körpertemperatur, ungewolltem Gewichtsverlust, Nachtschweiß und Abgeschlagenheit. Bei Kompression der Gefäße durch den Tumor oder vorhandenem Tumorzapfen in der Vena cava inferior kann eine Varikozele des linken Hodens bei Abflussbehinderung der linken Vena renalis oder ein einseitiges, meist links gelegenes Beinödem auffallen (Renz-Polster and Krautzig 2008, Ljungberg, Bensalah et al. 2015). Eine retrospektive Studie von 1999 bis 2010, die 165 Patienten mit klarzelligem Nierenzellkarzinom beobachtete, beschrieb in 23 % der Fälle eine Makrohämaturie als

erstes Symptom, gefolgt von abdominellen Schmerzen mit 16 % und einer Nierenkolik mit 13 %. Die Rate der zufällig entdeckten klarzelligen Nierenzellkarzinome wurde mit 20 % angegeben (Lorenzo-Gomez, Padilla-Fernandez et al. 2012).

#### 1.1.4.2 Paraneoplastische Symptome beim Nierenzellkarzinom

Wie bei anderen malignen Tumoren können auch beim Nierenzellkarzinom paraneoplastische Symptome auftreten. Dazu zählen unter anderem die arterielle Hypertonie, Hyperkalziämie, Polyglobulie oder das Stauffer-Syndrom. Sie entstehen durch Substanzen, die von den Tumorzellen ausgeschüttet werden, oder durch eine Modulation des Immunsystems. Etwa 30 % der symptomatischen Patienten mit einem Nierenzellkarzinom fallen primär durch ein paraneoplastisches Symptom auf (Ljungberg, Bensalah et al. 2015).

Die Polyglobulie wird durch eine vermehrte Ausschüttung von Erythropoetin (EPO) ausgelöst (Villanueva-Gimeno, Vicario-Bermudez et al. 2013). EPO wird als Antwort auf eine lokale Hypoxie physiologisch in den peritubulären interstitiellen Zellen der Niere produziert. Interessant ist, dass  $\frac{2}{3}$  der Patienten mit einem Nierenzellkarzinom erhöhte EPO-Spiegel aufweisen, wovon nur 8 % eine Polyglobulie ausbilden. Es wird daher davon ausgegangen, dass ein Teil des EPOs inaktiv ist (Palapattu, Kristo et al. 2002). Eine Hyperkalziämie tritt bei 13 bis 20 % der Patienten auf. Als paraneoplastisch zählt dabei nur die nicht-metastatische Hyperkalziämie, die durch die Produktion von Parathormon-related-Protein (PTHrP) im Tumorgewebe zustande kommt.

Eine arterielle Hypertonie kommt bei 40 % der Patienten mit Nierenzellkarzinom vor und ist typischerweise mit low-grade Tumoren und klarzelliger Histologie assoziiert. Sie ist durch eine erhöhte Renin-Bildung in neoplastischen Zellen des proximalen Tubulus bedingt oder entsteht als Antwort auf eine intrarenale Ischämie durch eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (Palapattu, Kristo et al. 2002). Bei 3 bis 20 % der Patienten findet sich eine hepatische Dysfunktion, die 1962 erstmals von Herrn Stauffer beschrieben wurde. Das Stauffer-Syndrom ist durch erhöhte Leberenzyme, eine verlängerte Thromboplastinzeit, eine erhöhte alkalische Phosphatase und eine Abnahme der hepatischen Syntheseleistung gekennzeichnet. Zudem sind eine Erhöhung des Bilirubins und der  $\gamma$ -Globuline möglich. Die Pathogenese zur Entstehung ist nicht genau bekannt. Eine Hypothese ist, dass die Nierenzellkarzinomzellen

Interleukin-6 und weitere Prostaglandine synthetisieren, die die Leberfunktion beeinträchtigen. Histologisch handelt es sich um eine generalisierte Hepatitis.

Zudem werden weitere paraneoplastische Symptome, wie das Cushing-Syndrom bei erhöhtem Adrenocorticotropem Hormon (ACTH), Galaktorrhoe durch Störung des Prolaktin-Haushaltes, Hypo- oder Hyperglykämien und Neuromyopathien beschrieben (Palapattu, Kristo et al. 2002).

#### 1.1.4.3 Metastasierung

Oft fällt das Nierenzellkarzinom erst durch Symptome auf, die durch Fernmetastasen in anderen Organsystemen bedingt sind. Die häufigsten Lokalisationen sind Lunge (50-60 %), Knochen (30-40 %), Leber (30-40 %), Nebennieren (20 %) und das Gehirn (5 %). Die Metastasierung erfolgt dabei hämatogen. Die klinische Symptomatik setzt sich aus Knochenschmerzen, Oberbauchschmerzen oder persistierendem Husten zusammen.

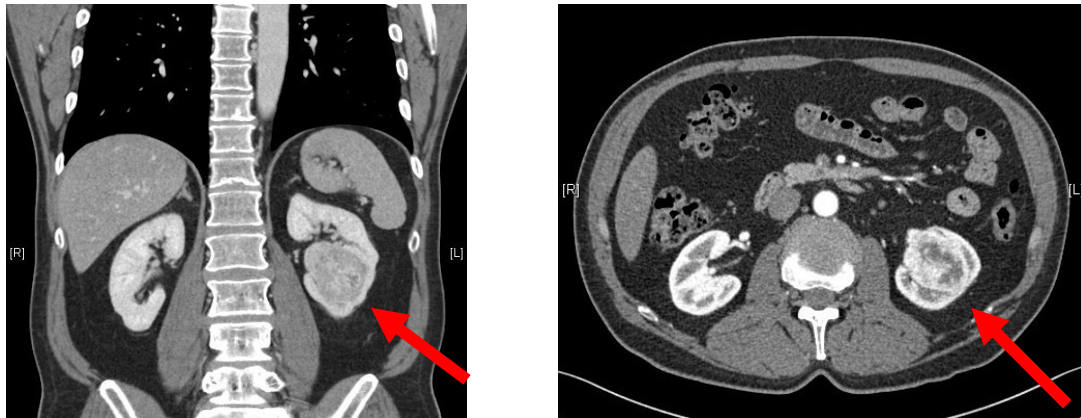
Neben diesen häufigen Metastasierungsmanifestationen treten weitere, seltenere auf, zum Beispiel Metastasen auf der Zunge (Ganini, Lasagna et al. 2012). Es liegen ebenfalls Fallberichte über obere gastrointestinale Blutungen oder Teerstuhl als primäres Symptom in der Folge von gastrointestinalen Metastasen vor (Sakurai, Muguruma et al. 2014), sowie Metastasen in der Haut als Primärsymptom (Mandal, Littler et al. 2012). Außerdem wurde das Auftreten von rezidivierendem Nasenbluten bei einer Metastase in der Nase beschrieben (Cobo-Dols, Ales-Diaz et al. 2006).

Des Weiteren kann es zu einer lymphogenen Metastasierung kommen, wobei besonders paraaortale und paracavale Lymphknoten betroffen sind.

#### 1.1.5 Diagnostik

Raumforderungen in der Niere können mit der abdominellen Sonographie erkannt werden. Noch präziser und minimal-invasiv ist die Kontrastmittel-Sonographie. Dabei werden feine Bläschen intravenös als Kontrastmittel verwendet, um die Perfusion in Echtzeit beurteilen zu können. Trotz der vielen Vorteile ist die Sonographie aufgrund der Lage der Raumforderung (tief gegenüber oberflächlich), Luftüberlagerungen des Darms, Körperstatur des Patienten sowie der Abhängigkeit von den Untersuchern limitiert (Houtzager, Wijkstra et al. 2013).

Deshalb ist zur Differenzierung einer renalen Raumforderung die Durchführung einer Computertomographie (CT) obligat. Um die Vaskularisierung des Tumors oder einen Einbruch in die Vena renalis oder Vena cava inferior beurteilen zu können, kann diese als Angio-CT erfolgen. Die CT weist bei der Detektion renaler Raumforderungen eine Sensitivität von 100 % und eine Spezifität von 95 % bei der Identifizierung eines Nierenzellkarzinoms auf (Dragoescu and Liu 2013).



**A**

**B**

**Abb. 1.1.5.1 A + B: CT-Abdomen.** Hier dargestellt sind zwei Ansichten einer Computertomographie des Abdomens eines Patienten. Bild A zeigt einen Koronarschnitt auf Höhe der Wirbelsäule. Es ist eine tumorsuspekte Raumforderung der linken Niere zu erkennen. Bild B zeigt einen Axialschnitt der gleichen CT-Serie. Es ist der gleiche zentral sitzende Tumor im Bereich der linken Niere zu sehen. Im Verlauf wurde die Diagnose eines klarzelligen Nierenzellkarzinoms histologisch bestätigt.

Eine andere Bildgebung stellt die Magnetresonanztomographie (MRT) dar. Sie kann bei Kontraindikationen für eine CT angewendet werden, ist jedoch seltener verfügbar, zeitintensiver und teurer. Bedacht werden sollte, dass weder CT noch MRT zwischen einem Onkozytom oder einem Angiomyolipom und einem malignen Nierenzellkarzinom differenzieren können (Ljungberg, Bensalah et al. 2015).

Von einer Biopsie zur histologischen Diagnosesicherung wird abgesehen, da eine Streuung der Tumorzellen entlang des Stichkanals mit Entstehung von Impfmastasen vermieden werden sollte. Bei einer kleinen Raumforderung mit atypischem Aussehen, Raumforderungen bei Patienten, die inoperabel sind und bei Patienten, bei denen eine absolute Kontraindikation für Kontrastmittel besteht, ist jedoch eine Feinnadelbiopsie indiziert. Bei Patienten mit einer Tumorerkrankung in der Vorgeschichte, könnte es sich um renale Metastasen handeln, sodass die Biopsie in diesen Fällen ebenfalls indiziert ist (Dragoescu and Liu 2013). In vielen Fällen enthält die entnommene Probe allerdings zu

wenig Material der zu untersuchenden Raumforderung, sodass ca. 20 % aller durchgeführten Biopsien ohne diagnostischen Erfolg bleiben (Leveridge, Finelli et al. 2011).

Ist die Diagnose gesichert, wird vor der Therapieplanung eine Metastasensuche durchgeführt. Empfohlen wird eine CT des Thorax, um pulmonale Rundherde zu detektieren. Daran schließt sich eine CT des Abdomens zur Beurteilung der lokalen Tumorausdehnung und zur Suche von abdominellen Metastasen an. Eine Bildgebung des Schädels oder der Knochen wird nur bei entsprechender klinischer Symptomatik oder labordiagnostischem Verdacht durchgeführt (Ljungberg, Bensalah et al. 2015).

## 1.1.6 Therapie

### 1.1.6.1 Therapie des lokal begrenzten Nierenzellkarzinoms

Die kurative Therapie für metastasenfreie Patienten ist die chirurgische Entfernung des Nierenzellkarzinoms. Bei einem Tumor < 4 cm (T1a) wird als Standard eine organerhaltende Nierenteilresektion durchgeführt. Bei Tumoren von 4 – 7 cm (T1b) ist die organerhaltende Nierenteilresektion bezüglich der Überlebensrate der Patienten gleichwertig gegenüber der radikalen Nephrektomie (Dash, Vickers et al. 2006, Milonas, Skulcius et al. 2013, Ljungberg, Bensalah et al. 2015). Ab T2 oder bei T1 mit positivem Lymphknotenstatus wird die radikale Nephrektomie empfohlen. Die Nebenniere wird nur sehr selten mitentfernt, ebenso wird die Entfernung von Lymphknoten bezogen auf den Überlebensvorteil kontrovers diskutiert und aus diesem Grund nicht standardmäßig durchgeführt (Ljungberg, Bensalah et al. 2015). Sowohl die radikale Nephrektomie als auch die Nierenteilresektion können offen-chirurgisch oder laparoskopisch durchgeführt werden. Eine Arbeit aus Korea hat beide Verfahren an insgesamt 2561 Patienten miteinander verglichen, wobei nur klarzellige Nierenzellkarzinome T1 und T2 N0 und M0 eingeschlossen wurden. Es konnte gezeigt werden, dass die Operationsdauer bei dem laparoskopischen Verfahren länger war, jedoch traten weniger Komplikationen und ein geringerer Blutverlust auf. Die 5-Jahres-Überlebensrate und das Rezidiv-freie Überleben war in beiden Gruppen gleich und lag bei ca. 94 % (Jeong, Rha et al. 2011). Die häufigste Komplikation der Nierenteilresektion ist eine Fistelbildung, sie wird mit 6,5 % angegeben. Als zweithäufigste Komplikation tritt in 6,3 % der Fälle eine ischämisch bedingte akute Tubulusnekrose auf. Diese Zahlen gehen aus einer Arbeit

hervor, die sich mit der offen-chirurgischen Nierenteilresektion gegenüber der radikalen Nephrektomie beschäftigt hat (Uzzo and Novick 2001).

Bei ausgewählten Indikationen kann die sogenannte “active surveillance“ angewendet werden, was mit aktiver Überwachung übersetzt werden kann. Es werden in regelmäßigen Abständen bildgebende Kontrollen mittels Sonographie, CT oder MRT durchgeführt. Wenn die Raumforderung größenprogredient ist, erfolgt eine operative Therapie. Bleibt die Größe unverändert, so kann eine Therapie hinausgezögert werden, da es sich wahrscheinlich um eine benigne Raumforderung oder um ein langsam wachsendes Nierenzellkarzinom handelt. Dieses konservative Vorgehen wird insbesondere bei asymptomatischen, älteren und multimorbiden Patienten angewendet, da diese aufgrund der altersbedingten limitierten Lebenserwartung nur eine sehr niedrige tumorassoziierte Mortalität aufweisen (Hwang, Yu et al. 2013, Smaldone, Corcoran et al. 2013, Ljungberg, Bensalah et al. 2015). Insbesondere Raumforderungen mit einem initialen Durchmesser unter 4 cm zeigen ein langsames Wachstum und nur in 1 % der Fälle kommt es während der “active surveillance“ zur Entstehung von Fernmetastasen (Quivy, Daste et al. 2013). Die Wachstumsgeschwindigkeit scheint hierbei ein guter prognostischer Parameter zu sein. Ein Wachstum von 0,1 – 0,4 cm pro Jahr bei pT1a-Tumoren geht nachgewiesen mit einer sehr geringen Tendenz zu einer Metastasierung einher (Tsaur, Schilling et al. 2013).

Des Weiteren können lokal ablative Verfahren angewendet werden. Dazu gehören die Kryotherapie und die Radiofrequenz-Ablation. Bei der Kryotherapie werden perkutan oder laparoskopisch Sonden in die Nähe des Tumors eingeführt und auf ca. -70 °C gekühlt, sodass das maligne Gewebe nekrotisiert. Bei der Radiofrequenz-Ablation werden über einen perkutanen Zugang, aber auch laparoskopisch oder offen-chirurgisch, Sonden appliziert, die Strom abgeben. Dadurch entstehen Temperaturen von bis zu 110 °C. Dies führt zu einem Absterben des Gewebes<sup>1</sup>. Eine Metaanalyse zeigte, dass die lokale Tumorprogredienz bei dem Kryoverfahren bei 5 % liegt, bei der Radiofrequenz-Ablation bei 13 % (Kunkle and Uzzo 2008, Castro, Jenkins et al. 2013). Es sind wenige Untersuchungen veröffentlicht, die große, randomisierte Daten vorstellen, in denen die lokal ablativen Verfahren mit der partiellen oder radikalen Nephrektomie bezüglich des Gesamtüberlebens verglichen wurden. Eine retrospektive Arbeit mit 15145 Patienten zeigte diesbezüglich, dass es keinen signifikanten Unterschied im Gesamtüberleben und dem tumorspezifischen Überleben gab (Choueiri, Schutz et al. 2011).

---

<sup>1</sup>[http://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/043-017Ol-I\\_S3\\_Nierenzellkarzinom\\_2015-09.pdf](http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/043-017Ol-I_S3_Nierenzellkarzinom_2015-09.pdf)

Eine adjuvante systemische Therapie wird aufgrund fehlender Evidenz aktuell nicht empfohlen (Ljungberg, Bensalah et al. 2015).

#### 1.1.6.2 Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms

Die Therapie des fortgeschrittenen Nierenzellkarzinoms stellt eine große Herausforderung dar, da dieser Tumor weder auf Strahlentherapie noch auf Chemotherapie gut anspricht. Eine Erklärung für das schlechte Ansprechen auf Chemotherapeutika ist, dass diese Tumore das multiple-drug resistance protein (MDR-Protein) überexprimieren und somit die Substanzen schnell wieder nach extrazellulär transportiert werden (Walsh, Larkin et al. 2009). Beim metastasierten Nierenzellkarzinom führt die Radiotherapie des Primärtumors zu keinem Vorteil gegenüber dem unbehandelten metastasierten Nierenzellkarzinom. Die Bestrahlung von Gehirn- oder Knochenmetastasen führt hingegen zu einer deutlichen Besserung der Beschwerden, insbesondere der Schmerzen. Somit kann eine palliative Radiotherapie zur klinischen Verbesserung durchgeführt werden, auch wenn die Annahme besteht, dass das Nierenzellkarzinom nicht bis kaum strahlensensibel ist (Huguenin, Kieser et al. 1998, Wilson, Hiller et al. 2003).

Bis vor einigen Jahren wurde standardmäßig die Immuntherapie angewandt. Die Patienten erhielten Interferon- $\alpha$  (IFN) als Monotherapie oder in Kombination mit Interleukin-2 (IL-2) und 5-Fluoruracil (5-FU) neben der intravenösen Hochdosistherapie mit IL-2. Eine randomisierte, multizentrische Studie an 1006 Patienten hat gezeigt, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen der Monotherapie und der Kombinationstherapie gab, jedoch zeigten einzelne Patienten eine Remission von relevanter Dauer, sodass die Immuntherapie immer noch eine Rolle zu spielen scheint (Gore, Griffin et al. 2010). Heute werden diese Therapieschemata seltener angewendet, was durch zahlreiche Kontraindikationen und neuere Therapiemöglichkeiten zu erklären ist.

Bei dem metastasierten Nierenzellkarzinom kann zur systemischen Immuntherapie mit IFN- $\alpha$  die zytoreduktive Nephrektomie oder Teilnephrektomie mit palliativem Ansatz erfolgen. In einer prospektiven, randomisierten Arbeit wurde die Monotherapie mit IFN und die Kombination von IFN mit der zytoreduktiven Nephrektomie verglichen, worin sich ein Überlebensvorteil bei der Kombination mit der Operation zeigte (Flanigan, Mickisch et al. 2004).



Die erste große Substanzgruppe der modernen, systemischen Therapieansätze waren die Tyrosin-Kinase-Inhibitoren (TKI), welche die Angiogenese im Nierenzellkarzinom hemmen. Dieser Gruppe gehören die Substanzen Sunitinib, Sorafenib und Pazopanib an. Weiterhin kann die Angiogenese durch Hemmung des Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) mit dem spezifischen Antikörper Bevacizumab inhibiert werden. Dieser wird nur in Kombination mit IFN angewendet.

Die zweite große Substanzgruppe in der systemischen Therapie des Nierenzellkarzinoms bilden die mammalian target of rapamycin-Inhibitoren (mTOR-Inhibitoren) mit den Substanzen Everolimus oder Temsirolimus. Diese sind für alle histologischen Subtypen des Nierenzellkarzinoms zugelassen (Staehler, Tullmann et al. 2010). Eine prospektive Studie in Frankreich verglich über einen Zeitraum von 10 Jahren (2000 bis 2010) an 111 Patienten die neuen Therapien mit der älteren Immuntherapie. Durch Anwendung der neuen Therapien zeigte sich ein besseres Ergebnis bezüglich des Gesamtüberlebens. Das mediane Überleben betrug in der Gruppe mit der neuen Therapie 21 Monate gegenüber 12 Monaten in der Gruppe, die die Immuntherapie mit IL-2 oder IFN erhielten (Nerich, Hugues et al. 2014). Eine anhaltende, komplette Remission (> 5 Jahre) konnte nur selten erreicht werden, sodass auch die systemische Therapie vor allem einen palliativen Ansatz darstellt.

Des Weiteren besteht die Option, Metastasen operativ zu resektieren. Aus einer retrospektiven Arbeit an 887 Patienten ging hervor, dass sich die vollständige Metastasenentfernung positiv auf das mediane, tumorspezifische Überleben auswirkte (4,8 Jahre gegenüber 1,3 Jahre ohne Metastasenresektion) (Alt, Boorjian et al. 2011).

#### 1.1.7 Prognose

Die Prognose hängt hauptsächlich von dem Stadium der Erkrankung bei der Erstdiagnose ab. Sie wird als 5-Jahresüberlebensrate (5-JÜR) in % angegeben. Zudem gibt es Unterschiede zwischen den histologischen Typen, die in der UICC- oder TNM-Klassifikation nicht berücksichtigt werden. Das papilläre und das chromophobe Nierenzellkarzinom zeigen zum Beispiel eine bessere Prognose als das klarzellige Nierenzellkarzinom (Cheville, Lohse et al. 2003). Auch der Grad (G1 bis G4) nach Fuhrman ist von prognostischer Relevanz: je differenzierter die Zellen, also je niedriger der Grad, umso seltener tritt eine Fernmetastasierung auf. Die erste Untersuchung des Zusammenhangs zwischen dem Auftreten von Metastasen und dem Grad nach Fuhrman

fand 1982 bei Patienten mit einem Nierenzellkarzinom im UICC-Stadium I statt (Fuhrman, Lasky et al. 1982).

Des Weiteren gibt es verschiedene Prognose-Scores. Die Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (MSKCC) Kriterien stehen zur Risikoklassifizierung für Patienten mit einem metastasierten Nierenzellkarzinom zur Verfügung. Hierbei lassen sich drei Gruppen bilden: niedriges Risiko mit 0 Faktoren, intermediäres Risiko mit 1 bis 2 Faktoren und hohes Risiko mit 3 oder mehr Faktoren (*s. Tab.1.1.6.1*).

Ein neueres Prognosemodell, ebenfalls für das metastasierte Nierenzellkarzinom, stellt das Database Consortium Model (DCM) dar. Dabei wurde das MSKCC-Model um die Neutrophilie und die Thrombozytose als Risikofaktoren erweitert, die Laktat-Dehydrogenase (LDH) wurde hingegen nicht berücksichtigt. Das DCM-Model scheint vor allem unter den modernen Therapien eine genaue Prognose zu geben (Heng, Xie et al. 2009). Eine retrospektive Studie hat Prognosefaktoren bei Patienten mit TKIs als Zweitlinientherapie untersucht. Dabei erwiesen sich eine erhöhte LDH, eine absolute Neutrophilie, die Zeit von der Diagnose des metastasierten Nierenzellkarzinoms bis zur Einleitung der Therapie mit TKIs < 1 Jahr und ein Eastern Oncology Cooperative Group performance status (ECOG PS) von 2 oder mehr Punkten als signifikante Faktoren für eine schlechtere Prognose. Nicht signifikant waren ein erhöhtes Serumkalzium und eine erhöhte Thrombozytenzahl (Poprach, Pavlik et al. 2013).

Für das lokal begrenzte Nierenzellkarzinom steht das UISS-System (University of California Los Angeles integrated staging system) zur Verfügung. Es beinhaltet TNM, Grad nach Fuhrman und den ECOG PS, das nahezu dem Karnofsky Performance Status entspricht (Verger, Salamero et al. 1992). Ein weiteres Score-System ist das SSIGN (Stage Size Grade Necrosis), das die Faktoren Stadium, Tumorgröße, Grad und Nekrose beinhaltet (Frank, Blute et al. 2002).

Die Prognose-Scores werden kontinuierlich modifiziert, erweitert oder um Faktoren reduziert. Sie geben jedoch eine Richtlinie für das individuelle Risikoprofil eines Patienten vor, an denen sich die Therapie wesentlich orientieren kann.

Karnofsky Performance Status	< 80 %
Zeit von Diagnose bis Beginn systemische Therapie mit IFN	< 12 Monate
Hämoglobin	< Untergrenze des Normwertes
Laktat-Dehydrogenase (LDH)	> 1,5-fach erhöht
korrigiertes Serumkalzium	> 2,5 mmol/l

**Tab. 1.1.7.1:** MSKCC-Kriterien (Motzer, Bacik et al. 2002).

Auf molekularer Ebene sind viele Parameter beschrieben, die nicht routinemäßig untersucht werden. Zu den wichtigsten zählen VEGF, Carboanhydrase-IX, Proliferationsfaktor Ki67, C-reaktives Protein (CRP), E-Cadherin und hypoxia-inducible factor (HIF) (Ljungberg, Bensalah et al. 2015). Es konnte gezeigt werden, dass die Heterogenität von Genen mit der Prognose zusammenhängt, jedoch konnte kein einzelnes Gen als sicherer Prognoseparameter identifiziert werden (Zhao, Ljungberg et al. 2006). Eine prospektive Arbeit mit 89 Patienten beschrieb Interleukin-6 (IL-6) und das CRP im Serum als Prognoseparameter bei dem lokal begrenzten Nierenzellkarzinom T1-T2 N0 M0. Dabei wurden präoperativ vor der radikalen Nephrektomie sowie 6 Tage und 6 Monate nach der Operation IL-6 und CRP im Blut bestimmt. Patienten mit erhöhten präoperativen Parametern zeigten ein signifikant schlechteres Überleben, wohingegen kein Zusammenhang zu den postoperativen Messwerten gefunden werden konnte (Hrab, Olek-Hrab et al. 2013). Eine weitere Arbeit konnte nachweisen, dass ein erhöhtes CRP gegenüber einem normwertigen CRP mit einer schlechteren Prognose beim metastasierten Nierenzellkarzinom und der Therapie mit Sunitinib korrelierte. Auch IL-6 scheint dabei eine Rolle zu spielen, da es die Synthese des CRP stimuliert. Es wurden erhöhte IL-6-Spiegel in Zusammenhang mit einer höhergradigen Erkrankung beschrieben (Beuselinck, Vano et al. 2013).

Nierenzellkarzinome mit einer Xp11.2 Translokation sind sehr selten, weisen aber eine schlechtere Prognose auf. Besonders bei jungen Erwachsenen und Kindern mit einem Nierenzellkarzinom ist diese Translokation häufig vorhanden, sodass bei diesen die entsprechende Diagnostik durchgeführt werden sollte (Armah and Parwani 2010, Klatte, Streubel et al. 2012).

## 1.2 Einfluss des Immunsystems auf die Tumorentstehung

In den letzten Jahren wurde der Begriff “Tumor-microenvironment“ geprägt. Damit ist die unmittelbare Tumorumgebung auf mikroskopischer oder molekularer Ebene definiert. In diesem Bereich spielen sich Prozesse ab, die für die Entstehung oder Eliminierung von Tumorzellen verantwortlich sind. Dass das endogene Immunsystem bei der Tumorentstehung und dem Tumorwachstum von großer Bedeutung ist, ist bereits bekannt (Koebel, Vermi et al. 2007), denn ein intaktes Immunsystem ist in der Lage, Tumorzellen zu erkennen und zu eliminieren. Es wird beschrieben, dass es neben der Eliminierung von Tumorzellen einen Gleichgewichtszustand in der Tumorentstehung gibt. Damit ist gemeint, dass sich entstandene maligne Zellen in einem Gleichgewicht aus Proliferation und Apoptose befinden. Überwiegt die Proliferation kommt es zur Tumorentstehung. Immunzellen können durch Apoptose-auslösende Effekte eine manifeste Tumorentstehung verhindern. Insbesondere das adaptive Immunsystem, also die humorale Immunantwort, scheint dabei eine Rolle zu spielen (Koebel, Vermi et al. 2007).

Versuche an Mäusen, deren humorales Immunsystem blockiert wurde, konnten darlegen, dass es bei diesen Tieren nach Karzinogen-Verabreichung schneller zu einer Tumorentstehung kam als bei Wild-Typ-Tieren. Die Experimente unterstützen die Hypothese, dass eine manifeste Tumorentstehung mithilfe eines gesunden Immunsystems verhindert werden kann (Koebel, Vermi et al. 2007).

Es gibt Hinweise dafür, dass in der Tumorumgebung eine lokale Hemmung des Immunsystems stattfindet. Die daran beteiligten Prozesse sind nur teilweise erforscht. Der Transkriptionsfaktor Signal transducer and activator of transcription-3 (STAT3) scheint einer der Faktoren zu sein, die die lokale Immunreaktion hemmen. Nach Blockierung von STAT3 in Tumorzellen kam es zu einem Anstieg pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine, sodass es zu einer tumorspezifischen Immunantwort kam. Hingegen ließe sich vermuten, dass STAT3 an der Unterdrückung der anti-tumoralen Immunantwort beteiligt ist (Wang, Niu et al. 2004).

Es konnte gezeigt werden, dass die Expression pro-inflammatorischer Mediatoren in Makrophagen und neutrophilen Granulozyten anstieg, in denen STAT3 ausgeschaltet wurde. In der Folge kam es zu einer Aktivierung des angeborenen Immunsystems. Diese Untersuchungen lassen vermuten, dass konstitutiv aktives STAT3 für eine Immuntoleranz verantwortlich ist (Yu and Jove 2004). Diesbezüglich belegte eine

Arbeit, dass STAT3 in Tumorzellen und den tumorassoziierten Immunzellen erhöht war (Lee, Deng et al. 2010). Zur Kontrolle dieser Signalwege gibt es Gegenspieler zu STAT3, unter anderem das Suppressor of cytokine signaling-Protein-3 (SOCS3).

Dass die Krebsentstehung mit chronischen Infektionen oder Entzündungen assoziiert ist, ist bereits bekannt. Bei einigen gastrointestinalen Tumoren wurde belegt, dass Entzündungsreaktionen der Tumorentstehung oft voraus gehen (Lin and Karin 2007, Inagaki-Ohara, Kondo et al. 2013).

Sind diese Mechanismen erforscht, könnte dies wichtige Ansatzpunkte für eine anti-onkogene oder zumindest additive Therapie liefern.

### 1.3 Signal transducer and activator of transcription-3 (STAT3)

#### 1.3.1 STAT3 Struktur und Funktion

Signal transducer and activator of transcription-Proteine (STAT-Proteine) sind Mediatoren, die die intrazellulären Signale von Zytokinen oder Wachstumsfaktoren steuern. Es sind insgesamt 7 STAT-Proteine bekannt, STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B und STAT6 (Yu and Jove 2004).

Das STAT3-Gen ist auf dem langen Arm des Chromosoms 17 lokalisiert. STAT3 ist ein monomeres Protein mit einem Molekulargewicht von 85 kD. Es kommt im Zytoplasma und im Nukleus nahezu aller Zellen des menschlichen Organismus vor und ist an der Proteinbiosynthese beteiligt, indem es als Transkriptionsfaktor agiert. Es enthält eine SH2-Domäne (Src homology 2), eine Proteindomäne bestehend aus ca. 100 Aminosäuren, mit der es an das Erbgut, die DNA, binden kann. Zielgene von STAT3 sind unter anderem Cyclin D1 (Proliferation), Bcl-x1 (zelluläres Überleben), KLF4 (Pluripotenz), VEGF und Matrix-Metalloproteinasen (Angiogenese) (Walker, Xiang et al. 2014).

STAT3 ist bei vielen Prozessen auf Zellebene beteiligt, u.a. bei der Zellproliferation und Apoptose, sowie bei der Angiogenese und der Tumorentstehung (Yu and Jove 2004). Versuche mit STAT3-knock-out-Mäusen konnten die Wichtigkeit bei der Zellproliferation bestätigen. Das Fehlen von STAT3 führte dabei zu einer frühen Letalität des Embryos (Takeda and Akira 2000). Ebenso ist bekannt, dass STAT3 in der Differenzierung der myeloischen Zellreihe in der Hämatopoese notwendig ist. Über die Produktion von Akute-Phase-Proteinen spielt STAT3 eine große Rolle in der

Immunabwehr, was durch Mutationen im STAT3-Gen bestätigt wird. Es präsentiert sich zum Beispiel klinisch als Hyper-IgE-Syndrom, das mit Hautekzemen, Abszessen durch Staphylokokken, rezidivierenden Infektionen der Lunge und erhöhtem Serum-IgE einhergeht (Holland, DeLeo et al. 2007, Minegishi, Saito et al. 2007). Dahingegen führt ein hyperaktives STAT3-Protein zu verschiedenen Erkrankungen, u.a. zu gastrointestinalen Erkrankungen, pulmonal-arterieller Hypertonie und zu diversen Tumorerkrankungen (Sehgal 2008).

### 1.3.2 Der JAK-STAT-Signalweg

Zum Verständnis der STAT3-Funktionen auf Zellebene ist der JAK-STAT-Signalweg von Bedeutung (*s. Abb. 1.3.2.1*). Extrazelluläre Liganden docken an Rezeptoren der Zelloberfläche an und aktivieren dadurch intrazellulär gelegene Rezeptorkinasen. Diese aktivieren rezeptorassoziierte Januskinasen (JAK) oder andere Kinasen, die sich durch Autophosphorylierung oder gekreuzte Phosphorylierung aktivieren. Sie sind Tyrosin- oder Serin-Kinasen (Murray 2007). Die aktiven JAKs phosphorylieren die intrazellulär gelegenen Enden der Rezeptoren. Daran docken wiederum intrazellulär STAT-Monomere an. Diese werden an Tyrosin- oder Serinresten phosphoryliert. Das STAT3 erhält dabei an Tyrosin705 einen Phosphatrest (Yu and Jove 2004). Danach bilden sie Homodimere oder auch Heterodimere aus. Diese Komplexe translozieren in den Nukleus und binden mit der SH2-Domäne an den DNA-Doppelstrang und beeinflussen die Genregulation unter Mitwirkung von Ko-Proteinen (Decker and Meinke 1997, Murray 2007).

Um die auf die Transkription folgende Reaktion zu stoppen, wird STAT3 dephosphoryliert, sodass sich die Dimere trennen und das freie STAT3 zurück in das Zytosol transportiert werden kann.

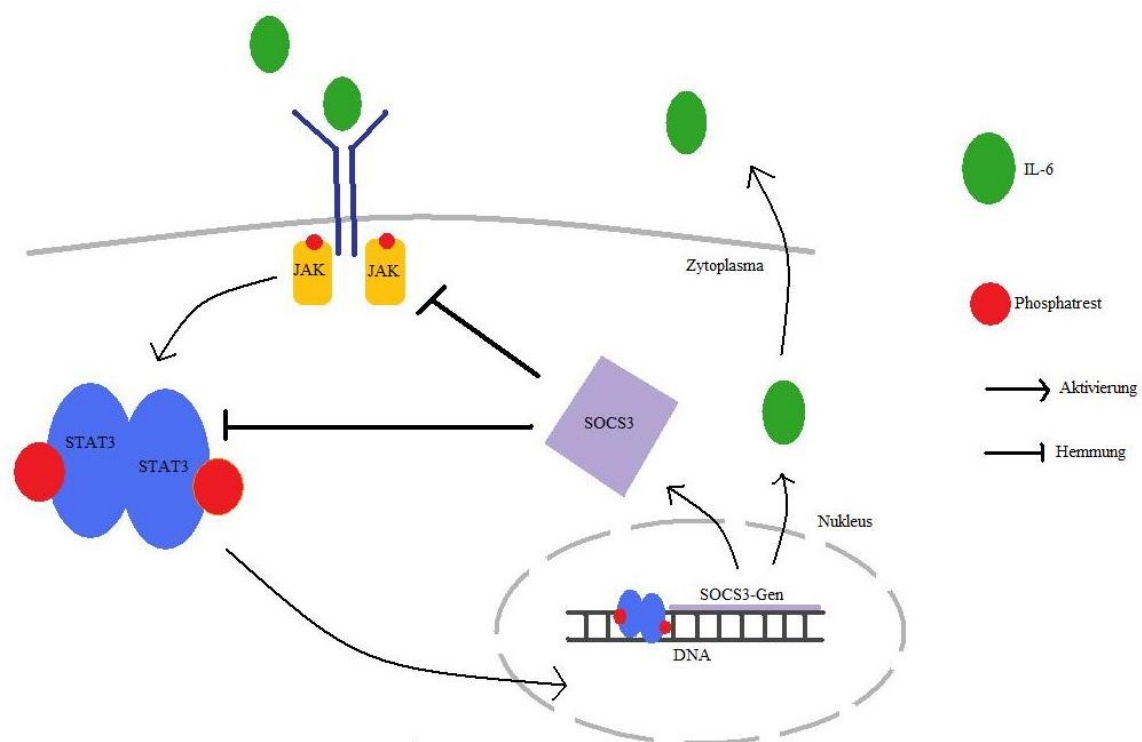
Das aktive STAT3 ist die phosphorylierte Form mit einem Phosphatrest, kurz pSTAT3. Es befindet sich meist innerhalb des Nukleus, um den Zielort – die DNA – zu erreichen. In geringen Mengen kommt es auch außerhalb des Nukleus, im Zytosol, vor (Sehgal 2008).

In der Literatur gibt es jedoch auch Untersuchungen, die zeigen, dass STAT-Proteine, insbesondere STAT3, auch ohne Phosphorylierung an die DNA binden und Funktionen ausüben können. Zudem scheint es kleine Vesikel im Zytoplasma zu geben, die STAT-Proteine enthalten. Zudem führt STAT3 zu einer Stabilisierung von mRNA im

Zytoplasma (Xu, Mukhopadhyay et al. 2007). Auch innerhalb der Mitochondrien übt STAT3 Funktionen aus, die von der nukleären Funktion unabhängig sind, woran die Phosphorylierung an Serin727 beteiligt ist (Walker, Xiang et al. 2014). Die genauen Schritte und Komponenten der Signalwege außerhalb des Zellkerns sind jedoch nicht bekannt.

Interessant und von großer Bedeutung sind die negativen Regulationsmechanismen des JAK-STAT-Signalweges, um die Expression entsprechender Zielgene zu stoppen, die sogenannten negativen Feed-back-Mechanismen.

Zum Beispiel kommt es nach der Phosphorylierung der JAKs zu deren Auto-Inaktivierung. Die Anzahl der Zytokin-Rezeptoren auf der Zelloberfläche kann reduziert werden, die JAKs und andere Kinasen können vom Rezeptor dissoziieren oder die STAT-Dimere dissoziieren zu Monomeren und verlassen den Nukleus (Murray 2007). Weiterhin gibt es Proteine, die die STAT-Aktivierung direkt hemmen. Eine herausragende Rolle spielen dabei die suppressor of cytokine signaling-Proteine (SOCS-Proteine).



**Abb. 1.3.2.1: Der JAK-STAT-Signalweg.** Die Abbildung stellt vereinfacht den JAK-STAT-Signalweg dar. Ein extrazellulärer Ligand, z.B. IL-6, hier grün, aktiviert einen transmembranen Rezeptor. An dessen intrazellulärer Seite befinden sich Januskinasen, die sich durch die Rezeptoraktivierung gegenseitig phosphorylieren und einen Phosphatrest, hier in rot, tragen. Nach Phosphorylierung sind die Januskinasen

aktiv und aktivieren das STAT3, hier in blau, das sich im Zytosol befindet. STAT3 wird durch die Januskinasen ebenfalls phosphoryliert und die Monomere lagern sich zu Dimeren zusammen. Die Dimere translozieren in den Zellkern und heften sich dort an die DNA, wo sie als Transkriptionsfaktor aktiv werden. Es kommt zur Transkription und Translation von Zielproteinen, z.B. SOCS3 und IL-6. Das SOCS3-Protein, hier in violett dargestellt, disloziert vom Zellkern ins Zytoplasma zurück und übt dort seine Funktionen aus. Es hemmt sowohl die Januskinasen als auch STAT3. (Abbildung selbst erstellt)

### 1.3.3 STAT3 in Tumorgewebe

STAT3 ist in verschiedenen, soliden humanen Tumoren als auch bei malignen Erkrankungen des blutbildenden Systems konstitutiv aktiv, indem es phosphoryliert vorliegt. Bekannt ist, dass es beim Mamma-Karzinom, Prostata-Karzinom, Pankreas-Karzinom, Multiplen Myelom, Lymphom, Plattenepithel-Karzinom des Kopf- und Halsbereiches sowie dem Ovarial-Karzinom eine Rolle spielt. Dabei induziert STAT3 die Tumorangiogenese und supprimiert die anti-tumoröse Immunantwort (Horiguchi, Oya et al. 2002, Yu and Jove 2004). Eine Arbeit widmete sich der pSTAT3-Expression im Mamma-Karzinom. Bei 40 % der humanen Mamma-Karzinome fand sich histologisch eine erhöhte pSTAT3-Expression. In einem Zellmodell mit Zellen der weiblichen Brustdrüse konnte zudem durch gezielte Ausschaltung von STAT3 eine Abnahme der Wachstumsgeschwindigkeit erzielt werden (Chang, Bournazou et al. 2013).

Verschiedene Mechanismen der konstitutiven STAT3-Aktivierung sind bekannt. Es existieren mutierte und somit überaktive Tyrosin-Kinasen oder fehlende negative Regulationsfaktoren. Weiterhin kann eine kontinuierliche Aktivierung des Rezeptors stattfinden, indem extrazelluläre Liganden durch autokrine oder parakrine Mechanismen in höheren Konzentrationen vorliegen (Walker, Xiang et al. 2014).

Neben der Induktion über extrazelluläre Zytokine findet auch eine autokrine Aktivierung von STAT3 statt, die das Zellwachstum Zytokin-unabhängig steuert. Dies wurde anhand von Zellreihen aus Plattenepithel-Karzinomen des Kopf- und Halsbereiches untersucht. Die Zell-Zell-Kontakte wurden mit Trypsin aufgelöst, was zu einer erniedrigten pSTAT3-Proteinexpression in den Zellen führte (Steinman, Wentzel et al. 2003).

STAT3 interagiert zudem mit anderen Signalwegen, was an Untersuchungen mit Mamma-Karzinom-Zellen festgestellt wurde (Yu, Pardoll et al. 2009, Walker, Xiang et al. 2014). Zum Beispiel führt eine NF- $\kappa$ B-Aktivierung zu einer gesteigerten Produktion



von IL-6, das wiederum STAT3 aktiviert. Im Gegensatz dazu induziert STAT3 die Expression von Inhibitoren wie miR-146b (microRNA), die NF- $\kappa$ B hemmen, womit die IL-6-Konzentration wieder sinkt. Somit ist eine kontrollierte inflammatorische Reaktion gegeben. In Tumorzellen erfolgt eine Methylierung am Promotor von miR-146b, sodass diese Hemmung entfällt. Es kommt zu einer kontinuierlichen Aktivierung von NF- $\kappa$ B und STAT3, und somit zu einer unkontrollierten Zellproliferation und Inflammation. Die hohen IL-6-Konzentrationen verstärken diese Funktion. Daraus lässt sich vermuten, dass eine chronische Entzündung, die zu einer NF- $\kappa$ B-Antwort führt, ein erhöhtes Risiko für Malignität darstellt.

#### 1.3.4 STAT3 im Nierenzellkarzinom

Konstitutiv aktives STAT3 ist auch bei der Entstehung und Progression des Nierenzellkarzinoms beteiligt. Diesbezüglich wurden in einer Arbeit immunohistochemische Untersuchungen in verschiedenen histologischen Nierenzellkarzinomen und makroskopisch unauffälligem Nierengewebe durchgeführt. Das pSTAT3 war bei 59,5 % der klarzelligen Nierenzellkarzinome immunohistochemisch darstellbar. Auch in papillären Nierenzellkarzinomen zeigten sich 57,1 % der Proben positiv für pSTAT3. Ein hoher Spiegel an pSTAT3 konnte mit einer signifikant schlechteren Prognose und Metastasierung in Zusammenhang gebracht werden (Guo, Yang et al. 2009). Dahingegen bestand kein Zusammenhang zu dem Tumorstadium oder dem histologischen Typ. Des Weiteren wurde das gesamte STAT3, abgekürzt als tSTAT3, immunohistochemisch bestimmt, welches sowohl die phosphorylierte als auch die nicht phosphorylierte Form beinhaltet. Es zeigte sich, dass sich im Nierenzellkarzinomgewebe und im Normalgewebe vergleichbare Mengen an tSTAT3 befanden. Dies ließe vermuten, dass die erhöhte STAT3-Aktivierung nicht in Verbindung mit einer Überexpression des gesamten STAT3 steht, sondern dass eine spezifische Steuerung der Phosphorylierung stattfindet (Horiguchi, Oya et al. 2002).

Eine *in vitro* Untersuchung bewies, dass STAT3 als wesentlicher Faktor an der IL-6-vermittelten Proliferation von Nierenzellkarzinomzellen beteiligt ist. Ein spezifischer JAK-Inhibitor konnte den STAT3-Signalweg hemmen, was zur Apoptose der Nierenzellkarzinomzellen führte (Horiguchi, Oya et al. 2002).

Die Expression von STAT3 und p53, ein Tumorsuppressorprotein, wurde in einer Arbeit auf Ebene der Genexpression in humanem klarzelligen

Nierenzellkarzinomgewebe von 47 Japanerinnen und Japanern untersucht. Eine erhöhte Expression von STAT3 zeigte sich mit einem kürzeren Gesamtüberleben assoziiert (Masuda, Kamai et al. 2009).

#### 1.4 Suppressor of cytokine signaling-Proteine (SOCS)

##### 1.4.1 SOCS-Proteine

SOCS-Proteine wurden im Jahr 1997 erstmalig entdeckt. Sie sind Teil der negativen Feed-back-Regulation bei Zytokin-Signalwegen und werden in Zusammenhang mit Autoimmunität, Allergie und Krebserkrankungen gebracht (Fujimoto and Naka 2003).

Es sind acht verschiedene SOCS-Proteine beim Menschen bekannt, SOCS1-SOCS7 und CIS (cytokine-inducible SH2 domain-containing protein). Sie befinden sich intrazellulär und werden durch Zytokine oder andere Liganden aktiviert. Der molekulare Aufbau ist bei allen SOCS-Proteinen ähnlich: sie enthalten eine zentrale SH2-Domäne sowie eine SOCS-Box am C-terminalen Ende, das N-terminale Ende ist variabel (Yoshimura 2009). Eine Theorie zur Funktion der SOCS-Proteine besagt, dass sie initial mit der SH2-Domäne an den Zytokin-Rezeptor binden, gefolgt von einem zweiten Schritt, in dem die sogenannte SOCS-Box einbezogen wird, die einen Komplex mit Proteinen bildet und die Ubiquitin E3 Ligase-Aktivität beinhaltet. Dort werden unter anderem phosphorylierte STAT-Proteine ubiquitiniert, degradiert und anschließend im Proteasomen-Komplex der Zelle abgebaut (Yoshimura 2009).

SOCS1, SOCS2 und SOCS3 zeigen selektive Funktionen in der Inhibierung von Zytokin-Signalwegen. Bei der Inhibierung von STAT3 zeigen besonders SOCS1 und SOCS3 wesentliche Funktionen (Murray 2007). Diese beiden Proteine agieren mit einem zusätzlichen Mechanismus, sie beinhalten eine kinase inhibitory region (KIR). Damit können sie die katalytische Aktivität der JAKs direkt hemmen (Inagaki-Ohara, Kondo et al. 2013).

##### 1.4.2 SOCS3 Struktur und Funktion

SOCS3 ist ebenfalls, wie STAT3, auf dem Chromosom 17 kodiert. Die Inhibierung des JAK-STAT-Signalweges findet durch Hemmung der JAK2-Aktivität statt. SOCS3 bindet an aktivierte Zytokin-Rezeptoren, die phosphorylierte Tyrosinreste tragen.

SOCS3 bindet mit seiner SH2-Domäne an die SHP-2-Domäne (Src homology phosphatase-2) des gp130-Rezeptors, der Teil des IL-6-Rezeptors ist, und hemmt so den Aktivierungsweg der JAK2 (Yoshimura 2009). Ohne den Korezeptor gp130 kann keine Hemmung der JAK stattfinden. Es wird beschrieben, dass SOCS3 in einem Komplex SOCS3-JAK2-gp130 vorliegt (Yoshimura, Naka et al. 2007, Kershaw, Murphy et al. 2013). Bekannt ist die Aktivierung von SOCS3 durch IL-6, IL-10 oder IFN- $\gamma$  (Yoshimura 2009). Weiterhin erhöhen IL-1, -2, -9, -13 oder IFN- $\alpha$  die SOCS3-Expression. Neben diesen Faktoren ist eine Stimulation durch EPO (Erythropoetin), G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) oder Leptin möglich (Ogata, Kobayashi et al. 2006). In einer Untersuchung mit SOCS3-Knock-out-Mäusen trat eine massive Erythrozytose auf, sodass davon ausgegangen werden kann, dass SOCS3 an der Hemmung des EPO-Signalweges mitwirkt. Andere *in vivo* Studien untersuchten die Rolle von SOCS3 in der Entwicklung der Plazenta. In den SOCS3-defizienten Tieren kam es zum frühen Tod des Embryos. Weitere Untersuchungen der Knock-out-Tiere bestätigten, dass das Fehlen von SOCS3 zu einer dauerhaften Aktivierung von STAT3 über IL-6 führte. SOCS3 scheint somit spezifisch in diesen Signalweg einzugreifen (Fujimoto and Naka 2003).

Aus der Literatur geht hervor, dass SOCS3 mit der atopischen Dermatitis in Zusammenhang steht (Ekelund, Saaf et al. 2006). In der Haut von Patienten mit atopischer Dermatitis konnten höhere Konzentrationen von SOCS3-mRNA gemessen werden als in der Haut von gesunden Personen. Auf Proteinebene zeigten sich ähnliche Ergebnisse (Ekelund, Saaf et al. 2006). Eine andere Arbeit beschäftigte sich mit SOCS3 auf mRNA- und Proteinebene bei Patienten mit atopischer Dermatitis gegenüber Patienten mit Psoriasis. Es wurde hier ebenfalls eine erhöhte SOCS3-Expression bei der atopischen Dermatitis beschrieben (Horiuchi, Bae et al. 2006).

#### 1.4.3 SOCS3 in Tumorgewebe

SOCS3 wurde in Zusammenhang mit Tumoren in verschiedenen Organsystemen untersucht. In einigen humanen Tumoren wurden erniedrigte SOCS3-Konzentrationen beobachtet, womit SOCS3 als tumorsuppressiver Faktor angesehen werden kann. Eine Hypermethylierung des SOCS3-Promotors wurde bei einem Großteil der Kopf- und Halstumore gefunden, gefolgt vom Lungen-Karzinom, Prostata-Karzinom, Barrett-

Ösophagus und dem kolorektalen Karzinom. Durch Hypermethylierung wurde die SOCS3-Expression gehemmt (Evans, Yu et al. 2007, Inagaki-Ohara, Kondo et al. 2013). Eine weitere Arbeit widmete sich dem hepatozellulären Karzinom (HCC) und der Virus-induzierten Hepatitis. SOCS3 war in dem Karzinomgewebe gegenüber dem Lebergewebe von Patienten mit Hepatitis erniedrigt. Zudem war die Karzinogen-induzierte Tumorentstehung unter Deletion des SOCS3-Gens signifikant erhöht. *In vitro* führte die SOCS3-Deletion in den Hepatozyten zur Erhöhung des anti-apoptotischen Proteins Bcl-xl sowie zu einer Suppression des IFN- $\gamma$ -Signalweges, der als Schutzmechanismus gegen ein Leberversagen dient. Die Deletion von SOCS3 führte zu einer beschleunigten Zellproliferation durch STAT3-Erhöhung und zu einer Apoptose-Resistenz, was in der Folge eine erhöhte Hepatitis-induzierte Karzinogenese hervorrief. SOCS3 reguliert demnach wesentlich das Überleben und die Karzinogenese in Hepatozyten (Ogata, Kobayashi et al. 2006).

#### 1.4.4 SOCS3 in Nierengewebe und im Nierenzellkarzinom

Bisherige Untersuchungen zu SOCS3 in Nierengewebe fanden an Patienten mit einer chronischen Nierenerkrankung statt. Eine niedrige SOCS3-Expression stand in Zusammenhang mit erhöhten Kreatininwerten und progredientem Nierenfunktionsverlust (Neuwirt, Eder et al. 2013).

Im Zellmodell mit proximalen Tubuluszellen konnte gezeigt werden, dass SOCS3 die Phosphorylierung von STAT3 hemmt. Weiterhin induzierte die gezielte Ausschaltung von SOCS3 die Differenzierung der Tubuluszellen mit simultanem Anstieg von pSTAT3 (Neuwirt, Eder et al. 2013).

Zu SOCS3 im Nierenzellkarzinom gibt es bisher nur wenige Publikationen. Es wurde berichtet, dass eine erhöhte SOCS3-Proteinexpression in humanen Nierenzellkarzinomgeweben mit einem schlechteren Überleben der Patienten zusammenhängt (Stofas, Levidou et al. 2014).

Eine Arbeit untersuchte die Rolle zwischen der Expression von SOCS3 und der Empfindlichkeit gegenüber einer Therapie mit IFN- $\alpha$  beim Nierenzellkarzinom. IFN- $\alpha$  agiert über den JAK-STAT-Signalweg und wird als Immuntherapie eingesetzt. SOCS3 wurde eine Hemmung des Interferon-Signalweges zugeschrieben. Anhand von *in vitro* Versuchen mit Nierenzellkarzinomzellen konnte dargestellt werden, dass eine Überexpression von SOCS3 für das schlechte Ansprechen der Therapie mit IFN- $\alpha$

verantwortlich ist. Durch Ausschaltung von SOCS3 konnte die Sensitivität gegenüber der Therapie wieder hergestellt werden, es handelte sich also um einen reversiblen Vorgang (Tomita, Ishibashi et al. 2011).

### 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Das Nierenzellkarzinom stellt mit 3 % aller Krebserkrankungen bei Erwachsenen nur einen kleinen Anteil dar, jedoch existieren in fortgeschrittenen Stadien nur begrenzte Therapiemöglichkeiten. Daher ist das Verständnis molekularer Mechanismen in der Entstehung und Progression des Nierenzellkarzinoms für die Entwicklung neuer Therapieansätze von großer Bedeutung. Aufgrund der hohen Prävalenz des klarzelligen Nierenzellkarzinoms unter allen Nierentumoren, beschäftigt sich diese Arbeit nur mit diesem histologischen Typ.

In der vorliegenden Arbeit soll die Expression von SOCS3 in humanem Tumorgewebe gegenüber gesundem Nierengewebe untersucht werden. Des Weiteren sollen in *in vitro* Versuchen mit der Caki-1-Zelllinie Induktionsfaktoren zur SOCS3-Expression ermittelt werden. Gelingt es, eine unterschiedliche Regulation in der Expression von SOCS3, bzw. STAT3, zwischen dem Tumorgewebe und dem gesunden Nierengewebe aufzuzeigen, so könnte dies ein neuer Ansatzpunkt in der Behandlung des klarzelligen Nierenzellkarzinoms darstellen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Reagenzien und Chemikalien

<u>Substanz</u>	<u>Hersteller</u>
AA/BA 30 % (Acrylamid Bisacryl Gel 30)	Roth, Karlsruhe
Agarose-Pulver	Roth, Karlsruhe
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Roth, Karlsruhe
Avidin/Biotin Blocking Kit	Enzo Life Sciences
Aquatex	MerckMillipore
BSA (bovine serum albumin)	AppliChem, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
CaCl <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt
Chloroform	AppliChem, Darmstadt
DDT (Dichlordiphenyltrichlorethan)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	GIBCO-BRL, Eggenstein
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DNase	Roche, Mannheim
DNase-Puffer	Roche, Mannheim
ECL-System (enhanced chemiluminescence)	GE Healthcare, München
ELISA 96-well-Platten (für Bradford)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Eppendorf-Gefäße 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf-Gefäße 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Ethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethidium-Bromid	Roth, Karlsruhe
FCS (fetal calf serum)	GIBCO-BRL, Eggenstein
Fettstift	Marabu, Deutschland
Filterpapier für WB	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Glaspipettenspitzen	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glycin	Roth, Karlsruhe
Haematoxylin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Interferon- $\gamma$	TEBU/Peptrotech, Frankfurt/M.
Interleukin-6	TEBU/Peptrotech, Frankfurt/M.
Interleukin-10	TEBU/Peptrotech, Frankfurt/M.
Interleukin-22	TEBU/Peptrotech, Frankfurt/M.
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Frankreich
Kryoröhrchen mit Schraubverschluss	ThermoScientific
Magermilchpulver	Merck, Deutschland
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Methanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
MOPS (3-(N-Morpholino)propansulfonsäure)	AppliChem, Darmstadt
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
NaCl	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
NaF	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
NaOH	Roth, Karlsruhe
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Neubauer Zählkammer	Laboroptik, Großbritannien
Nitrocellulose Membran Hybond™-Extra	GE Healthcare, München
Objektträger Superfrost plus	ThermoScientific
PageRuler Prestained Protein Ladder	ThermoScientific
Penicillin G	Life Technologies, USA
Pipetten für Pipet-Boy	Costar Stipette, USA
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Roth, Karlsruhe
Ponceau Lösung	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Protease Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics, Mannheim
PVDF-Membran (Polyvinylidendifluorid)	Roche Diagnostics, Mannheim
Realtime TaqMan™ – Fast Advanced Master Mix	Invitrogen, Karlsruhe
Realtime TaqMan™ Sonden	Applied Biosystems, Heidelberg
Reverse Transkriptase (RT) - PCR Reagenzien	Applied Biosystems, Darmstadt
Röntgenfilm (Amersham Hyperfilm™ECL)	GE Healthcare, München
Roti-Nanoquant-Lösung	Roth, Karlsruhe
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Merck, Darmstadt
Skalpell (Einweg)	Feather, Japan
Streptavidin HRP complex	Axxora
Streptomycin	Life Technologies, USA

TaqMan-96-well-Platten	Life Technologies, USA
TaqMan-96-well-Platten-Abdeckfolie	Life Technologies, USA
Taq-Polymerase	Promega, Mannheim
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	AppliChem, Darmstadt
Tissue-Tek O.C.T. Kryoeinbettmedium	Sakura, Niederlande
Tissue-Tek Cryomold Einbettgeschälchen	Sakura, Niederlande
Tris-CL	AppliChem, Darmstadt
Triton X100 (v/v)	Roth, Karlsruhe
Trizol TriFast	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypan-Blau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tween 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Whortmann 3MM Papier	Milipore, Schwalbach
Zellkultur Plastikmaterial	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellschaber Kunststoff	Sarstedt, USA

## 2.2 Gewebeproben

Gewebeproben der Patienten stammen aus dem UCT (Universitäres Centrum für Tumorkrankheiten) der Goethe-Universitätsklinik Frankfurt am Main sowie von Patienten aus der Urologischen Klinik der Philipps-Universität Marburg. Die schriftliche Einverständniserklärung der Patienten für die Operation als auch für die Verwendung des Gewebes für Forschungszwecke wurde vor dem Eingriff eingeholt und liegt vor. Diese sowie das Studiendesign wurden durch die Ethikkommissionen der Goethe-Universitätsklinik Frankfurt am Main (Geschäftsnummer 04/09 UGO 03/10) und der Philipps-Universitätsklinik Marburg (Geschäftsnummer 122/14) genehmigt. Es wurden insgesamt Proben von 35 Patienten mit histopathologisch gesichertem klarzelligen Nierenzellkarzinom in die Studie eingeschlossen, davon 12 Frauen (34 %) und 23 Männer (66 %). Das mediane Alter der eingeschlossenen Patienten liegt bei 63 Jahren, der Mittelwert bei 64 Jahren (Bereich von 42 – 84 Jahre). Die Frauen haben einen Altersdurchschnitt von 63 Jahren, die Männer von 65 Jahren. Die klinischen Charakteristika der Patienten sind der *Abb. 2.2.1* zu entnehmen.

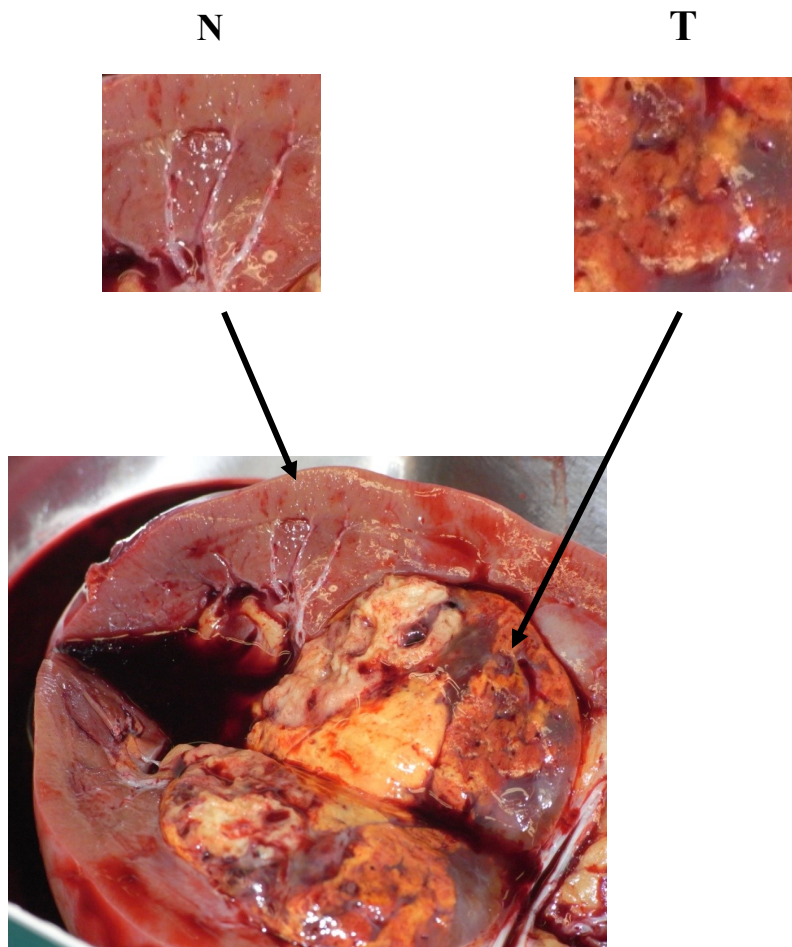
Ausschlusskriterien waren Erkrankungen des Immunsystems inklusive Autoimmunerkrankungen, Erkrankungen des blutbildenden Systems und sekundäre Neoplasien. Weiterhin wurden Patienten mit immunsuppressiver Therapie, zum



Beispiel Einnahme von Kortikosteroiden, ausgeschlossen. Alle Patienten erhielten im Rahmen des Stagings präoperativ eine entsprechende Bildgebung in Form von CT und/oder MRT. Unmittelbar nach der Nephrektomie oder Teilnephrektomie wurde Material sowohl aus dem Tumorgewebe als auch aus dem benachbarten makroskopisch gesunden Nierengewebe entnommen. Im Folgenden werden die Tumorproben mit T und die Proben aus dem gesunden Nierengewebe mit N gekennzeichnet (*s. Abb. 2.2.2*). Sie wurden bis zur Verarbeitung bei -80 °C aufbewahrt. Die histopathologische Untersuchung wurde nach der UICC TNM Klassifizierung für das Nierenzellkarzinom vorgenommen (Erdogan, Demirel et al. 2004). Die histopathologischen Stadien pT1 und pT2 sowie pT3 und pT4 wurden jeweils zu einer Gruppe zusammengeführt. Ebenso die Grade G1 und G2 sowie G3 und G4.

<i>Parameter</i>	
<i>Anzahl Patienten</i>	35
<i>Altersdurchschnitt</i>	64
<i>Altersmedian</i>	63
<i>Alter x-x</i>	42-84
<i>weiblich</i>	34%
<i>männlich</i>	66%
<i>pT1/2</i>	57 %
<i>pT3/4</i>	43 %
<i>pN0</i>	46 %
<i>pN+</i>	8 %
<i>pNx</i>	46 %
<i>cM0</i>	77 %
<i>cM+</i>	23 %
<i>G1/2</i>	83%
<i>G3/4</i>	17 %

**Abb. 2.2.1: Merkmalsverteilung der eingeschlossenen Patienten.** Es wurden n = 35 Patienten eingeschlossen. Der Altersdurchschnitt lag bei 63 Jahren, der Median bei 64 Jahren. Die Altersverteilung lag zwischen 42 und 84 Jahren. Der Anteil weiblicher Patienten belief sich mit n = 12 auf 34 %, der Anteil männlicher mit n = 23 auf 66 %. Die histopathologische Klassifizierung pT1 und pT2 fand sich bei 57 % der Patienten. pT3 und pT4 bei zusammen 43 %. pN0 fand sich bei 46 % der Patienten, pN+ bei 8 %. Bei 46 % wurde keine Angabe zum N-Status gemacht. Klinisch metastasenfrei waren 77 % der Patienten (cM0), eine Fernmetastasierung fand sich bei 23 % (cM+). Die Grade G1 und G2 fanden sich bei 83 % der Patienten, G3 und G4 zusammen bei 17 %.

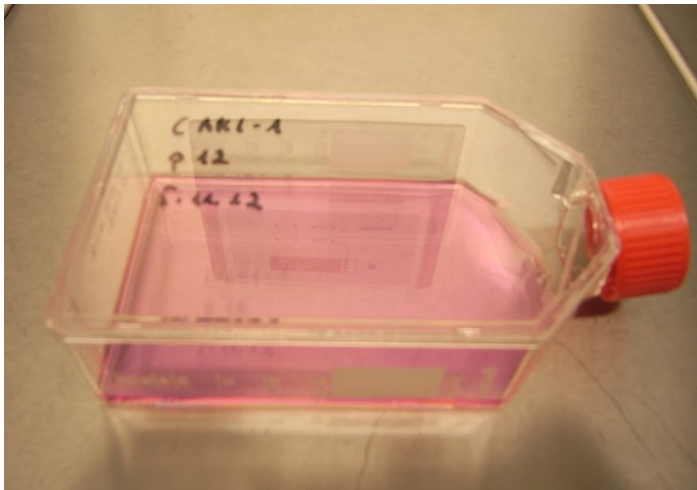


**Abb. 2.2.2: Beispiel einer frisch entnommenen Niere mit klarzelligem Nierenzellkarzinom.** Zu sehen ist ein zentral sitzendes Nierenzellkarzinom nach longitudinaler Durchtrennung der operativ entfernten Niere. Der Tumor beinhaltet unregelmäßige gräuliche und gelbliche Strukturen inmitten des homogenen Nierenparenchyms. Aus dem Tumor wurde ein Gewebestück entnommen, gekennzeichnet mit T. Im makroskopisch benachbarten, tumorfreien Nierengewebe wurde ebenfalls ein Stück Gewebe entnommen, das gesunde Nierengewebe, gekennzeichnet mit N. Die Gewebeproben wurden direkt in Kryoröhrchen überführt und in Gefrierschränken bei -80 °C aufbewahrt. (eigenes Bildmaterial)

### 2.3 Kultur der Caki-1 Zellen

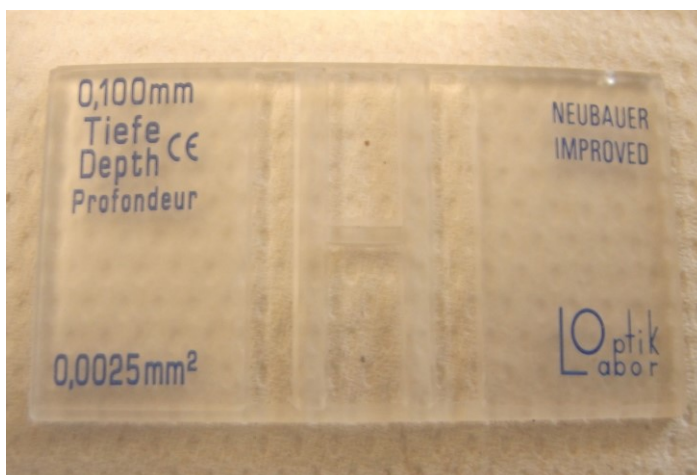
Die humane Caki-1-Zellreihe (LGC Promochem, Wesel, Germany) wurde aus einem Kaukasier mit metastasiertem klarzelligem Nierenzellkarzinom 1971 isoliert. Es handelt sich um eine adhäsiv wachsende und Kolonien bildende Zellreihe. Sie wurde als ein repräsentatives Modell für Epithelien des proximalen Tubulus validiert (Glube, Giessl et al. 2007). Die Kultivierung erfolgte bei 37,0 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in einem Brutschrank der Firma Heraeus Instruments. Die Zellen wurden in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen kultiviert

(s. Abb. 2.3.1). Dazu wurden pro Flasche 100.000 Zellen ausgesät und mit dem Medium DMEM, FCS und Penicillin/Streptomycin auf ein Volumen von 10 ml aufgefüllt. Alle drei Tage wurde das Zellmedium gewechselt. Die Zellkulturflasche wurde täglich unter dem Mikroskop beobachtet. Wenn die Zellen den Boden der Flasche komplett bedeckten, wurden sie für die Versuche vorbereitet. Zur Zellernte wurde das überstehende Medium mit einer Glaspipette abgesaugt. Die Zellen wurden mit 10 ml PBS gewaschen und anschließend mit 3 ml Trypsin für 5 Minuten im Brutschrank inkubiert und vom Boden abgelöst. Ein Teil der Zellen wurde zur weiteren Kultivierung in eine neue Flasche gegeben. Für die *in vitro* Versuche wurden die Zellen mithilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt und in einer Dichte von  $6 \times 10^6$  Zellen/2ml in 6-well-Platten ausgesät.



**Abb. 2.3.1: Zellkulturflasche.** Die Abbildung zeigt eine Zellkulturflasche, in denen die Caki-1-Zellen im Brutschrank kultiviert wurden. Das Zellkulturmedium bedeckt mit wenigen Millimetern den Boden, auf dem die Zellen gleichmäßig ausliegen. Der rote Drehverschluss der Flasche, rechts im Bild, enthält Poren, wodurch ein Luftaustausch stattfindet, sodass die

Umluft im Brutschrank mit 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> an die Zellen gelangt. (eigenes Bildmaterial)



**Abb. 2.3.2: Neubauer-Zählkammer.** Die Abbildung zeigt eine Neubauerzählkammer (improved). Sie wird verwendet, um die Zellzahl in einer Flüssigkeit zu bestimmen. Mittig befinden sich eingravierte Zählgitter, in denen lichtmikroskopisch die Zellen ausgezählt werden können und die Konzentration der Zellen im Zellmedium ermittelt werden kann. (eigenes Bildmaterial)

<u>Zusammensetzung des Zellkulturmediums:</u>	500 ml	DMEM
	10 %	FCS
	100 U/ml	Penicillin G
	100 µg/ml	Streptomycin

## 2.4 RNA-Analytik

### 2.4.1 Isolierung von RNA aus den Gewebeproben

Die auf Trockeneis zerkleinerten 50-100 mg großen Gewebestücke wurden in 2 ml Eppendorfgefäße mit 1 ml Trizol aufgenommen und mit dem TURRAX OMNI International homogenisiert. Die Proben wurden auf Eis (4 °C) gestellt und ausschließlich auf Eis weiter bearbeitet. Nach dem Homogenisieren folgte das Abzentrifugieren der Zellreste für 10 Minuten bei 13.300 rpm. Der Überstand wurde sorgfältig abpipettiert und in autoklavierte, 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt. Hinzu wurden 200 µl Chloroform je Probe gegeben, 5 Sekunden gevortext und anschließend 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Proben erneut für 15 Minuten bei 13.300 rpm zentrifugiert, sodass sich die wässrige und die organische Phase voneinander trennen (s. Abb. 2.4.1.1). Der Überstand wurde abpipettiert und in neue 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt. Darauf folgte zum Ausfällen der RNA, der Präzipitation, die Zugabe von 1 ml Isopropanol. Der Präzipitation folgten zwei Waschgänge mit 70%-igem Ethanol, verdünnt in DEPC-ddH<sub>2</sub>O zur Aufreinigung der RNA. Zwischen den beiden Waschgängen wurden die Proben mit 9.000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Nach dem letzten Waschgang trocknete die RNA bei Raumtemperatur für eine Stunde. Danach wurde sie in 30 µl DEPC-ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und manuell durchpipettiert. Alle Lösungen wurden mit DEPC-ddH<sub>2</sub>O hergestellt, um einen RNA-Abbau durch RNAsen zu verhindern. Aus diesem Grund wurden auch ausschließlich autoklavierte Eppendorfgefäße verwendet.

Die Messung der RNA-Konzentration erfolgte durch Messung der optischen Dichte (OD) mittels Absorptionsspektrometrie (Gerät Nano-Drop ND-1000 Spectrometer 3.1.0). RNA und DNA absorbieren ultraviolettes Licht, das Absorptionsmaximum liegt bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Quotienten 260nm/230nm und 260nm/280nm wurden ebenfalls erfasst und protokolliert, um die Proteinbeimengung und somit den Grad der Verunreinigung zu erheben. Unmittelbar vor der Messung wurden die RNA-

Proben manuell durchpipettiert. Kalibriert wurde mit DEPC-ddH<sub>2</sub>O. Jede Probe wurde zweimal gemessen, sodass der Mittelwert zur Konzentrationsbestimmung benutzt werden konnte. Die Konzentration wurde in ng/μl angegeben.



**Abb. 2.4.1.1: Phasentrennung bei der RNA-Isolierung.** Das Bild zeigt ein 1,5 ml Eppendorfgefäß, leicht schräg gehalten. Bei der sogenannten Phasentrennung resultiert ein 2-Phasen-System. Die weniger polaren Proteine sammeln sich in der unteren, weniger polaren Lösung. Oben ist die wässrige Schicht, in welcher sich die RNA befindet. Für die weitere Isolierung wird die obere Phase abpipettiert und in ein neues Eppendorfgefäß überführt (s. Abschnitt 2.4.1). Die weiße Linie zwischen den beiden Phasen entspricht der Interphase, sie enthält Verunreinigungen, Proteinreste und DNA (s. roter Pfeil).

#### 2.4.2 Isolierung von RNA aus der Zellkultur

Die Isolierung der RNA aus der Zellkultur erfolgte analog, mit dem Unterschied, dass die Zellen zuvor in 6-well-Platten ausgesät wurden. Nach Beendigung der Stimulation wurden die Überstände abpipettiert und die 6-well-Platten auf Eis gestellt. Anschließend wurde zweimal mit PBS gewaschen. Pro Well wurde 1 ml Trizol zugegeben, die Platten wurden kurz geschwenkt und daraufhin das Trizol mit den abgelösten Zellen abpipettiert und in 2 ml Eppendorfgefäße überführt. Daran schlossen sich die Schritte von 2.4.1 an.

#### 2.4.3 DNase-Verdau und Phenolextraktion

Mit allen RNA-Proben wurde ein DNase-Verdau durchgeführt, da die SOCS3-mRNA nur ein Exon und keine Introns enthält und die folgende Realtime-TaqMan-PCR gegebenenfalls DNA-Reste detektieren könnte. Pro 10-50 μg RNA wurden 2,5-10 Einheiten DNase und 5 μl 10x-Puffer verwendet. Die entsprechende Menge RNA wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß pipettiert und mit DEPC-ddH<sub>2</sub>O auf 44 μl aufgefüllt. Dazu wurden 1 μl DNase und 5 μl 10x-Puffer (in unten angegebener Zusammensetzung) pipettiert. Anschließend folgte eine Aktivierung der DNase bei

37 °C für 15 Minuten. Zur Inaktivierung wurde in jedes Eppendorfgefäß 2 µl einer 0,2 M EDTA-Lösung (in DEPC-H<sub>2</sub>O, pH 8,0) gegeben. Anschließend erfolgte die Inkubation bei 75 °C für 10 Minuten, danach wurden die Eppendorfgefäße auf Eis gestellt. Daraufhin folgte die Phenolextraktion. Dazu wurde in gleichen Volumenteilen saures Phenol (pH = 4) und Chloroform in das Eppendorfgefäß hinzugefügt. Dann kurzes Vortexen und anschließend Zentrifugieren mit 13.000 rpm für 10 Minuten bei 4 °C. Der Überstand wurde in neue Eppendorfgefäße überführt. Je nach entnommenem Volumen erfolgte die Zugabe von 0,1 Volumenteil NaAC 3 M pH 5,4 sowie 2,5 Volumenteile Ethanol (-20 °C) in jedes Gefäß mit nachfolgender Inkubation bei -20 °C für 15 Minuten. Danach Zentrifugieren bei 13.000 rpm und 4 °C. Es folgte ein zweimaliger Waschgang mit 80%-igem Ethanol. Das Endprodukt wurde nach Trocknen bei 37 °C in DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen.

<u>DNase:</u>	10 units/µl
<u>DNase-Puffer:</u>	20 mM Tris-HCl
	50 mM NaCl
	2 mM CaCl <sub>2</sub>
	2 mM MgCl <sub>2</sub>
	1 mM Dithioerythriol
	0,1 mg/ml Pefabloc SC
	50 % Glycerol (v/v)
	pH = 7,6

<u>10x-Inkubations-Puffer:</u>	400 mM Tris-HCl
	100 mM NaCl
	60 mM MgCl <sub>2</sub>
	10 mM CaCl <sub>2</sub>
	pH = 7,9

#### 2.4.4 RNA-Gelelektrophorese

Um eine Degradierung der isolierten RNA auszuschließen, wurde eine RNA-Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurden 1%-Agarose-Gele (mit unten angegebenen Zusätzen) mit je 20 Taschen hergestellt, in die jeweils 2 µg RNA und die

dreifache Menge eines Ethidiumbromid-haltigen fA-Mix pipettiert wurde. FAE-Puffer wurde um das Agarose-Gel gegeben und eine Stromquelle angeschlossen. Es wurde ein elektrisches Feld mit einer Spannung von 100 Volt für die Dauer von einer Stunde angelegt. Die RNA ist negativ geladen und läuft daher zum Plus-Pol. Je kleiner die RNA-Fragmente sind, umso schneller laufen sie durch das Elektrophorese-Gel. Die Banden wurden anschließend unter UV-Licht sichtbar gemacht.

Gel: 1,4 g Agarose + 72,5 ml DEPC-ddH<sub>2</sub>O  
10 ml 10x FAE-Puffer  
17,9 ml Formaldehyd

10x FAE-Puffer (1 l): 83,72 g MOPS  
8,2 g Na-Acetat  
100 ml 0,1 M EDTA pH 8,0  
mit ddH<sub>2</sub>O auf 1 Liter auffüllen

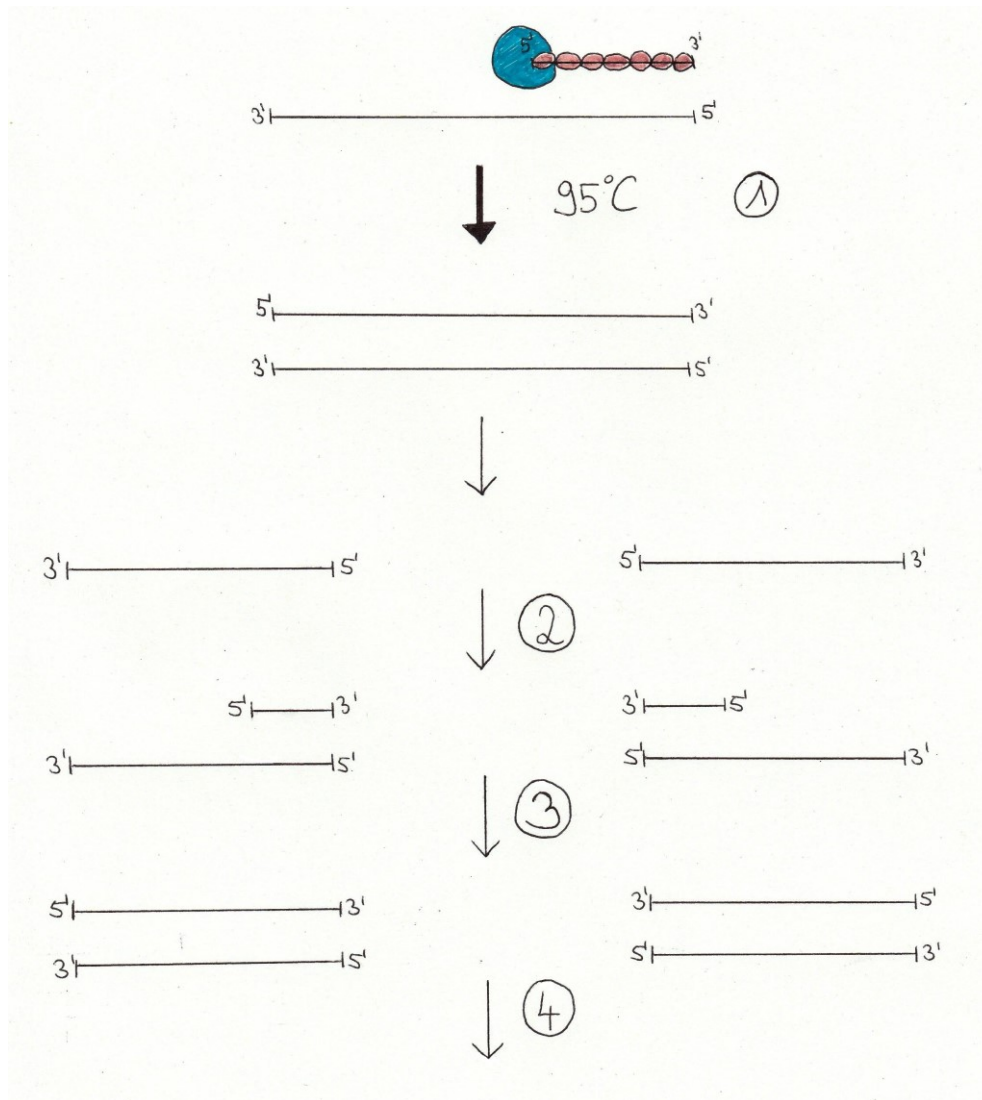
#### 2.4.5 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

##### 2.4.5.1 Allgemeine Grundlagen der RT-PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein Verfahren zur Vervielfältigung eines bestimmten Abschnittes der DNA. Zur Vervielfältigung von RNA muss diese erst in DNA umgeschrieben werden mithilfe einer reversen Transkriptase (RT-PCR). Die reverse Transkriptase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase und baut aus einem RNA-Einzelstrang zuerst einen RNA-DNA-Hybrid-Doppelstrang. Danach wird der RNA-Strang abgebaut und der DNA-Einzelstrang zu einem DNA-Doppelstrang synthetisiert. Dieser wird als komplementäre DNA bezeichnet, kurz cDNA. Das Verfahren der PCR wurde 1986 erstmals publiziert (Mullis, Faloona et al. 1986). Um den gewünschten Bereich einer RNA zu vervielfältigen und umzuschreiben, werden sogenannte Primer eingesetzt. Dies sind Oligonukleotide, die spezifisch an die DNA binden. Die Polymerase sucht sich diese markierten Bereiche und beginnt dort mit der Synthese des gegenläufigen Stranges. Dazu werden freie Desoxynukleosidtriphosphate benötigt. Auf diesen Schritt folgt eine Erhitzung auf 95 °C, wodurch es zum Lösen der Wasserstoffbrücken im Doppelstrang kommt und zum Auftrennen der Doppelstränge in



Einzelstränge. Danach beginnt der Zyklus von vorne. Abb. 2.4.5.1.1 zeigt schematisch einen PCR-Zyklus. Da bei 95 °C die meisten Enzyme denaturieren und ihre Funktion verlieren, so auch die Polymerasen, wurde nach einer hitzestabilen Polymerase gesucht. Die Taq-Polymerase bleibt bei diesen Temperaturen stabil und behält ihre Funktion. Taq ist die Abkürzung für *Thermus aquaticus*, ein in heißen Quellen in Geysiren lebendes Bakterium (Saiki, Gelfand et al. 1988).



**Abb. 2.4.5.1.1: Schematische Darstellung einer PCR.** Die Abbildung zeigt vereinfacht den Ablauf einer PCR. Ganz oben ist ein Einzelstrang dargestellt, an den sich die Primer (rot) anlagern. Die Polymerase (blau) erkennt diese und beginnt mit der Synthese des gegenläufigen Stranges. Der Doppelstrang wird durch Erhitzen auf 95 °C in zwei Einzelstränge aufgetrennt, dies umfasst Schritt 1, das Denaturieren. An die Einzelstränge legen sich erneut Primer an, hier nur schematisch dargestellt, diesen Schritt 2 bezeichnet man als Anlagerung. Die Polymerase dockt erneut an und baut den gegenläufigen Strang zusammen wodurch jeweils ein neuer Doppelstrang entsteht, Schritt 3 bezeichnet man als Elongation. Aus initial einem Doppelstrang sind nun 2 Doppelstränge entstanden. Der Zyklus beginnt von vorne mit Erhitzen und Denaturieren (Schritt 4). Der spezifische DNA- oder RNA-Abschnitt wird damit exponentiell vervielfältigt. (Eigenes Bildmaterial)



#### 2.4.5.2 Transkription der RNA zu cDNA

Die isolierte RNA wurde in cDNA umgeschrieben mittels Random Hexameric Primers und der Muloney Virus Reversen Transkriptase nach Angaben des Herstellers (Applied Biosystems). Diese Transkriptase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die in E.coli-Stämmen gezüchtet wurde. Es wurde jeweils 1 µg RNA umgeschrieben. Folgendes Programm wurde im Thermocycler Biometra T3000 für die RT-Reaktion verwendet:

30 min.	42 °C
5 min.	95 °C
Pause bei	10 °C

Die RNA wurde in 200 µl Eppendorfgefäße pipettiert, das Gesamtvolumen betrug 20 µl. Folgender Gesamtansatz wurde für die RT-Reaktion benutzt:

4 µl	25 mM MgCl <sub>2</sub>
2 µl	10x PCR-Puffer
4 µl	10 mM dNTP-Mix
1 µl	RNAse-Inhibitor (20 U/ml)
1 µl	50 µM Random Hexameric Primers
1 µl	Reverse Transkriptase (50 U/ml Muloney Virus)
2 µl	RNA-Probe (1 µg)
5 µl	DEPC-ddH <sub>2</sub> O

#### 2.4.6 Realtime TaqMan-Polymerase-Kettenreaktion (TaqMan-PCR) zur Analyse von SOCS3, IL-6, CA-IX

##### 2.4.6.1 Grundlagen der Realtime TaqMan-PCR

Ziel vieler Untersuchungen ist es, spezifische Proteine und deren exprimierte Menge in einem Gewebe nachzuweisen. Dazu wird die spezifische mRNA, die das gesuchte Protein kodiert, detektiert. Eine Quantifizierung der mRNA findet durch Anwendung der Echtzeit-PCR, übersetzt Realtime-PCR, statt. Sie dient zum Nachweis einer

spezifischen mRNA, bzw. der umgeschriebenen cDNA. Es wird die absolute von der relativen Quantifizierung unterschieden. Wir verwendeten die relative Quantifizierung, bei der die Expression der mRNA in Relation zu einem nicht regulierten Gen untersucht und berechnet wird. Das unregulierte Gen wird als Haushaltsgen oder Housekeeping-Gen bezeichnet (Pfaffl 2001). Oft wird die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet, ein Enzym der Glykolyse. Es wurde jedoch untersucht, dass die Transkription der GAPDH-mRNA zwischen Individuen, als auch beim selben Individuum zu unterschiedlichen Tageszeiten sehr starken Schwankungen unterliegt. Auch in Tumorgeweben sind die Stoffwechselprozesse wie die Glykolyse im Gegensatz zu gesundem Gewebe verändert. GAPDH wird aus diesen Gründen für Untersuchungen zwischen verschiedenen Individuen oder in Tumorgeweben nicht empfohlen (Bustin and McKay 1999, Bustin 2000). Wir verwendeten daher das large-ribosomal-protein (RPL-P0). Es ist ein Protein der 60S-Untereinheit der Ribosomen im Zytoplasma von humanem Gewebe.

Die Detektion der PCR-Produkte erfolgt mithilfe von Fluoreszenzsignalen. Die verwendeten TaqMan-Sonden beinhalten an einem Ende einen sogenannten Quencher, am anderen Ende einen Reporter-Fluoreszenzfarbstoff. Die Nähe zwischen diesen beiden Enden führt zu einer Suppression der Fluoreszenz. Da die Taq-Polymerase zusätzlich eine Exonuklease-Aktivität enthält, wird die Sonde von der Zielsequenz verdrängt, sodass sich schließlich der Quencher vom Reporter trennt. Die Suppression fällt weg und es kommt zu einer gesteigerten Reporter-Aktivität, ein Fluoreszenzsignal wird gemessen. Die Fluoreszenz nimmt proportional zur Menge des PCR-Produktes zu (Bustin 2000).

Als Ergebnis der Quantifizierung der ursprünglich vorhandenen Startmenge einer mRNA wird ein Ct-Wert angegeben. Ct ist die Abkürzung für das englische Wort "cycle threshold" und gibt den Zyklus an, in dem ein ausreichendes Fluoreszenzsignal ermittelt werden kann. Je höher der Ct-Wert, umso mehr Zyklen waren notwendig, um die Ziel-mRNA nachzuweisen, und umso weniger der mRNA befand sich in dem Ausgangsmaterial. Umgekehrt, je kleiner der Ct-Wert, umso früher konnte ein Signal detektiert werden und umso mehr Material befand sich in der ursprünglichen Probe. Zur Erstellung einer Kalibrierungskurve sind Kontrollproben notwendig, Proben ohne Zugabe von cDNA. Die Berechnung des Verhältnisses zwischen untersuchter mRNA und der mRNA des Haushaltsgens erfolgte durch die  $2^{-\Delta CT}$ -Methode. Die weitere Datenanalyse wurde mit Hilfe der Sequence Detector Software durchgeführt.

#### 2.4.6.2 Durchführung der Realtime TaqMan-PCR

Die quantitative Genexpression von SOCS3, IL-6, CA-IX wurde mittels Realtime-TaqMan-PCR untersucht. Verwendet wurde der AbiPrism 7,700 Sequence Detector von Applied Biosystems. Nach Umschreiben von mRNA in cDNA wurden die Proben bis zur Messung bei -20 °C aufbewahrt. Die vorgefertigten Sonden, die mit dem Matrizen-Strang hybridisieren, wurden bei -20 °C gelagert. Sie wurden vor Verwendung auf Eis und lichtgeschützt aufgetaut. Die Messung erfolgte in Doppelbestimmung je Probe. Es wurden Negativproben auf jeder 96-well-Platte eingesetzt, eine RT-Kontrolle ohne Hinzugabe von RNA sowie Mastermix mit Sonde ohne cDNA, jeweils in Doppelbestimmung.

In jedes Well der 96-well-Platte wurde folgender Ansatz pipettiert:

5 µl	Advanced TaqMan-MasterMix
3,5 µl	ddH <sub>2</sub> O
0,5 µl	Sonde
1 µl	cDNA

Die Platte wurde mit einer Folie abgedeckt und anschließend kurz bei 800 rpm anzentrifugiert.

Das PCR-Programm enthielt die folgenden Phasen:

50 °C	02:00 min.
95 °C	00:20 min.
95 °C	00:03 min.
60 °C	00:30 min.

Es wurden 45 Zyklen durchlaufen.

#### Sonden für TaqMan-PCR:

SOCS3	#Hs00269575_s1	(ThermoScientific)
RPL-P0	#Hs99999902_m1	(ThermoScientific)
CA-IX	#Hs00154208_m1	(ThermoScientific)
IL-6	#Hs00985639_m1	(ThermoScientific)

## 2.5 Proteinanalytik

### 2.5.1 Isolierung von Proteinextrakten aus den Gewebeproben

Von dem Gewebe wurden auf Trockeneis Stücke von ca. 100 mg abgeschnitten und in autoklavierte, 1,5 ml Eppendorfgefäße mit 1 ml Lysis-Puffer überführt. Mit dem TURRAX OMNI International wurde das Gewebe homogenisiert um die intrazellulären Proteine freizusetzen. Der TURRAX wurde nach jeder Probe gereinigt, zuerst mit ddH<sub>2</sub>O, dann 100 % Ethanol und zuletzt wieder mit ddH<sub>2</sub>O. Die Proben ruhten hiernach 15 Minuten auf Eis, damit sich der entstandene Schaum absetzen konnte. Darauf folgte das Abzentrifugieren der Zellreste bei 4 °C, 13.300 rpm für 5 Minuten. Der Überstand wurde abpipettiert und in neue 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt.

Die Proben wurden bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

#### Lysis-Puffer (100 ml):

2,5 ml Tris (1 M, pH 7,4)  
3 ml NaCl (5 M)  
100 µl CaCl<sub>2</sub> (1 M)  
10 ml Triton X100 (10 %)  
84,5 ml ddH<sub>2</sub>O

Für 1 ml frischen Lysis-Puffer wurden 960 µl Lysis-Puffer (s.o.) und 40 µl Protease Inhibitor Cocktail zusammengegeben.

#### Zusätze je 1 ml Lysis-Puffer:

1 µl DTT (1 M)  
10 µl PMSF (100 mM)  
10 µl NaF (0,5 M)  
1 µl Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (1 M)

### 2.5.2 Isolierung von Proteinextrakten aus der Zellkultur

Nach Stimulierung und Inkubation der Zellen in den 6-well-Platten wurden zunächst die Überstände abgenommen und die Platten auf Eis gestellt. Sie wurden zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurde je Well 1 ml Lysispuffer mit Protease Inhibitor Cocktail dazugegeben. Mit Zellschabern wurden die Zellen vom Boden der Wells abgelöst und in 1,5 ml Eppendorfgefäße pipettiert. Die Zellreste wurden abzentrifugiert und der Überstand in neue 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt. Die Aufbewahrung erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C.

### 2.5.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration der Proben wurde nach der Bradford-Methode bestimmt (Bradford 1976).

Dazu wurde eine Eichgerade mit 0, 20, 30, 40, 50, 60, 80 und 100 µg/ml BSA (Rinder-Serumalbumin) erstellt. BSA-Standard wurde mit ddH<sub>2</sub>O auf eine Konzentration von 100 µg/ml verdünnt. Die Proteinproben wurden nach Austestung verschiedener Konzentrationen (1:100, 1:200, 1:400) für das weitere Vorgehen auf 1:200 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt. Bei dieser Verdünnung lagen die Messwerte innerhalb der Standardgeraden.

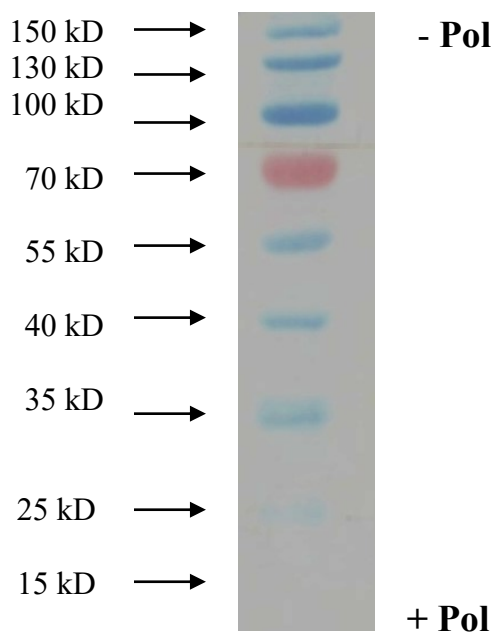
Von der Standardlösung sowie von den Proben wurden jeweils 50 µg in ein Well einer 96-well-Platte mit flachem Boden pipettiert. Dazu wurden je 200 µl verdünnte Roti-Nanoquant-Lösung gegeben (Verdünnung 1:4 mit ddH<sub>2</sub>O). Die Proteinkonzentration wurde in 96-well ELISA Microplates (greiner bio-one) bei 595 nm gemessen.

### 2.5.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe erfolgte nach der von Lämmli publizierten Methode der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli 1970). Das SDS, Natriumdodecylsulfat, bindet an Proteine und enthält viele negative Ladungen, sodass die Proteine entsprechend ihrer Größe und nicht der Eigenladung aufgetrennt werden können. Die Proteine durchlaufen zuerst ein Sammelgel und dann ein Trenngel in einem vertikalen System. Für SOCS3, ein kleines Protein mit 23 kD wurde ein 12 % Trenngel benutzt, für STAT3, ein mittelgroßes Protein mit 85 kD ein Gel mit 10 %. Als zweites Protein pro Gel wurden tSTAT3 und

$\beta$ -Tubulin zur späteren Relativierung der Proteinexpression, dargestellt. Es wurden jeweils 50  $\mu$ g Protein pro Tasche aufgetragen. Als Marker wurde PageRuler Prestained Protein Ladder benutzt (s. Abb. 2.5.4.1). Die Elektrophorese erfolgte im Sammelgel mit einer Spannung von 100 V und im Trenngel mit 140 V.

Die Proteine wurden auf ein Volumen von 10  $\mu$ l mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt und dann mit 10  $\mu$ l Lämmli-Puffer versetzt.



**Abb. 2.5.4.1: Geblottete Membran mit Darstellung der Banden des Markers.** Ein Marker wird eingesetzt, um zu sehen, auf welcher Höhe der Membran sich welche Proteingröße befindet, um letztlich auf dem fertigen Westernblot die Größe der Banden-bildenden Proteine einordnen zu können. Die rötliche Bande zeigt 70 kD an. Oberhalb davon, Richtung Minuspol, liegen die größeren Proteine, unterhalb davon, Richtung Pluspol, liegen die kleineren Proteine. Die Laufrichtung der Proteine geht vom Minus- zum Pluspol, da die Proteine mit SDS behaftet sind, das eine starke negative Ladung besitzt. Je kleiner das Protein, desto schneller läuft es durch das Gel und desto weiter ist es vom Startpunkt entfernt. (eigenes Bildmaterial)

4x Lämmli-Puffer:

62 mM Tris-HCl pH 6,8

2 % SDS

5 %  $\beta$ -Mercaptoethanol

10 % Glycerin

0,0025 % Bromphenolblau

β-Tubulin, SOCS3: 12 % SDS-PAGE  
pSTAT3, tSTAT3: 10 % SDS-PAGE

1,25 ml	Sammelgelpuffer 4x
0,65 ml	AA/BA 30 %
3,10 ml	ddH <sub>2</sub> O
75 µl	APS 10 %
7,5 µl	TEMED

0,5 M                      Tris-HCl  
0,5 %                      SDS  
HCl → pH = 6,8

2,5 ml	Trenngelpuffer 4x
2,5 ml	AA/BA 30 %
4,09 ml	ddH <sub>2</sub> O
150 µl	APS 10 %
15 µl	TEMED

2,5 ml	Trennpuffer 4x
2,5 ml	AA/BA 30 %
3,5 ml	ddH <sub>2</sub> O
150 µl	APS 10 %
15 µl	TEMED

1,5 M Tris-HCl  
0,5 % SDS  
NaOH → pH = 8,8

100 ml	10 % SDS
37,5 g	Tris-Base (250 mM)
180 g	Glycin (2 M)

### 2.5.5 Western-Blot-Analyse zur Bestimmung der Proteine SOCS3, $\beta$ -Tubulin, pSTAT3 und tSTAT3

Wir verwendeten für den Westernblot den SOCS3-Antikörper in der Verdünnung 1:500. Um die Proteinmenge des jeweiligen Gewebes mit dem Housekeeping-Protein zu normieren, wurde zudem  $\beta$ -Tubulin dargestellt. Mit einem Molekulargewicht von 55 kD liegt dieses auf dem Blot nicht auf gleicher Höhe wie SOCS3 mit 23 kD. Durch Schneiden der Membranen konnten danach beide Antikörper in einem Arbeitsschritt inkubiert werden. Die Banden von  $\beta$ -Tubulin ließen sich mit dem herkömmlichen Substrat (Bio-Rad, München) kräftig darstellen, während die SOCS3-Banden erst nach Zugabe eines stärkeren Substrates (GE Healthcare) sichtbar wurden.

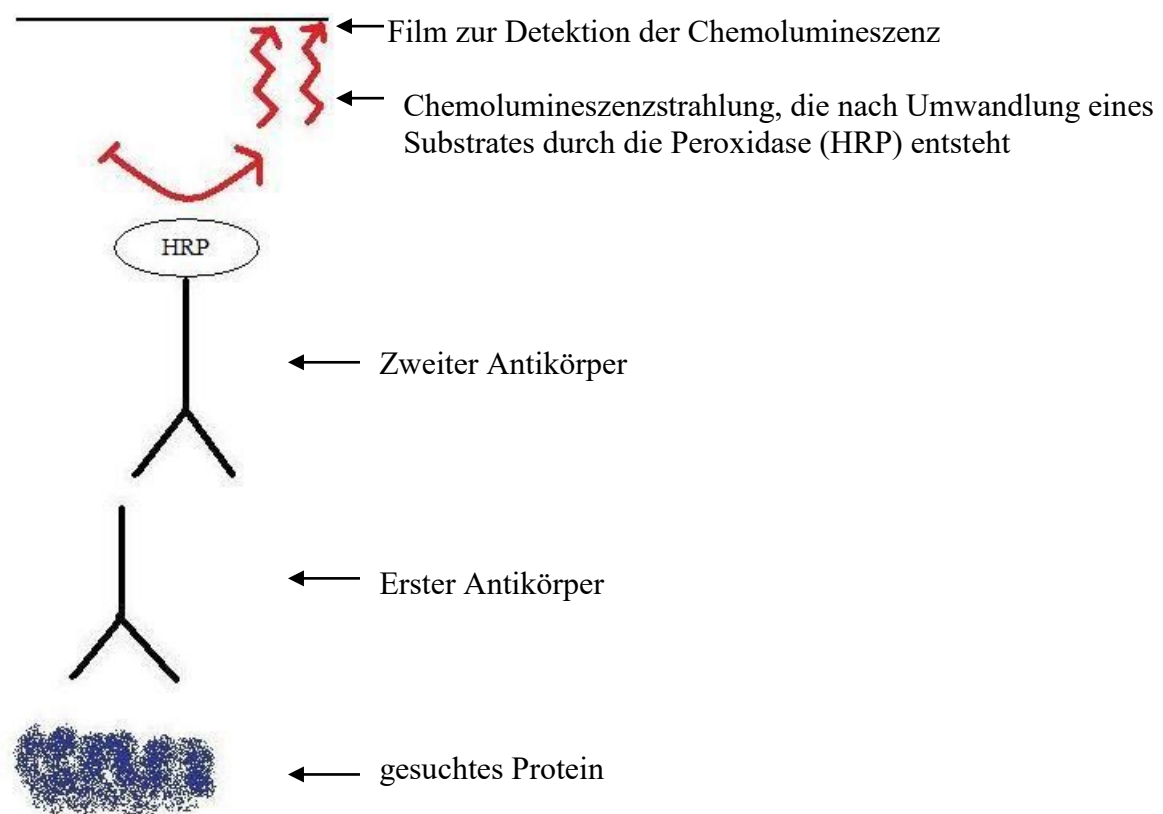
Nach der Gelelektrophorese wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran geblottet, um  $\beta$ -Tubulin und SOCS3 nachzuweisen. Die Membran wurde zuvor 3 Minuten in reinem Methanol aktiviert. Für pSTAT3 und tSTAT3 wurde eine Nitrocellulose-Membran verwendet. Die Membran und das Filterpapier wurden für 5 Minuten in Transferpuffer eingelegt. In der Apparatur wurden von dem Plus- zum Minuspol folgende Schichten aufgebaut: 3 Schichten Filterpapier, Membran, Gel, 3 Schichten Filterpapier. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte bei einer Stromstärke von  $0,8 \text{ mA/cm}^2$  für 75-90 Minuten (große Proteine 90 Minuten, kleinere Proteine 75 Minuten). Nach Beendigung des Vorgangs wurden die Membranen mit Ponceau-Lösung gefärbt, um eine gleichmäßige Proteinbeladung sichtbar zu machen. Diese reversible Färbung wurde durch Waschen mit TBST für  $3 \times 10$  Minuten entfernt. Um freie Proteinbindungsstellen zu besetzen, wurden die Membranen für 90 Minuten in 3% MM (Magermilch)/TBST bzw. 5% BSA/TBST bei Raumtemperatur inkubiert. Eine gleichmäßige Inkubation wurde durch Nutzung des Schwenktisches Heidolph Duomax 1030 garantiert.

Nach der Inkubation wurden die Membranen  $3 \times 10$  Minuten in TBST gewaschen. Der Primärantikörper wurde in 3% MM/TBST aufgenommen und die Membran darin über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurde die Membran erneut  $3 \times 10$  Minuten in TBST gewaschen. Der Sekundärantikörper wurde in 2,5% MM/TBST verdünnt und die Membran darin 90 Minuten inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde erneut  $3 \times 10$  Minuten in TBST gewaschen. Die Detektion der gesuchten Proteine erfolgte durch Chemolumineszenz nach Zugabe des jeweiligen Substrates nach Angaben des Herstellers. Das Substrat wird durch die an den sekundären Antikörpern haftende



Peroxidase umgesetzt und emittiert Licht, das durch Fluoreszenzfilme detektiert werden kann (s. Abb. 2.5.5.1).

Da pSTAT3 und tSTAT3 das gleiche Molekulargewicht haben, muss der erste Antikörper von der Membran entfernt werden. Die Membran wurde nach der Darstellung von pSTAT3 mit 0,2 M NaOH bei Raumtemperatur 10 Minuten gestrippt, wodurch sich der 1. Antikörper ablöst. Anschließend wurden die Membranen 3 x 10 Minuten in TBST gewaschen, erneut 90 Minuten geblockt und dann mit dem tSTAT3-Antikörper über Nacht inkubiert. Um die Ergebnisse quantifizieren zu können, wurden die Westernblot-Banden mit einem Carestream Kodak Imager digitalisiert. Die Banden von SOCS3 wurden relativ zu der jeweiligen  $\beta$ -Tubulin-Bande ausgewertet, die von pSTAT3 relativ zu tSTAT3.



**Abb. 2.5.5.1: Schematische Darstellung Westernblot.** Dargestellt ist vereinfacht das Schema eines Westernblots inklusive Umwandlung des Substrates durch die Peroxidase (HRP), die an den sekundären Antikörper angeheftet ist. Unten in blau dargestellt ist das zu detektierende Protein, zum Beispiel SOCS3. Daran heftet sich der 1. Antikörper, dessen kurze Arme, die  $F_{ab}$ -Fragmente spezifisch gegen SOCS3 gerichtet sind. Der einzelne, lange Arm des Antikörpers wird als  $F_c$ -Fragment bezeichnet. Nach Waschgängen wird der Sekundärantikörper hinzugegeben, der mit seinem  $F_{ab}$ -Fragment an das  $F_c$ -Fragment des 1. Antikörpers bindet. Am  $F_c$ -Fragment des sekundären Antikörpers befindet sich ein

gebundenes Enzym, die Peroxidase (HRP = Horseradish peroxidase). Nach erneuten Waschgängen, mit denen die nicht gebundenen Antikörper entfernt werden, gibt man ein Substrat hinzu. Dieses wird durch die Peroxidase umgewandelt und es entsteht Chemolumineszenz. Mit speziellen Filmen lässt sich diese detektieren und es entstehen Banden. Es zeigt sich eine Westernblotbande an der Stelle, wo sich das zu suchende Protein befindet. (eigenes Bildmaterial)

Für den SOCS3-Westernblot wurde eine Positivkontrolle hergestellt. Dazu wurde die Zellreihe A549, eine Epithelzelllinie aus der Lunge, für 30 Minuten mit IL-22 stimuliert. Nach dieser Zeit konnte eine vermehrte SOCS3-Proteinexpression gemessen werden (Hoegl, Bachmann et al. 2011). Die SOCS3-Proteinexpression steigt an und bleibt Diese Positivkontrolle wurde neben dem Marker auf jedem Blot aufgetragen.

<u>Transferpuffer:</u>	5,82 g	Tris
	2,93 g	Glycin
	3,75 ml	SDS 10 %
	200 ml	Methanol

<u>TBST 10x:</u>	100 mM Tris-HCl pH 8,0
	0,5 % Tween 20
	1,5 M NaCl

Primärantikörper:

<u>Bezeichnung</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Hersteller</u>
β-Tubulin, #sc-555-29	1:5000 (2,5 % MM/TBST)	Santa Cruz
SOCS3, #sc-9023	1:500 (3 % MM/TBST)	Santa Cruz
pSTAT3, Tyr705, #9145	1:1000 (2,5 % MM/TBST)	Cell Signaling
tSTAT3, #9139	1:1000 (2,5 % MM/TBST)	Cell Signaling

Sekundärantikörper:

<u>Bezeichnung</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Hersteller</u>
Ziege anti-Kaninchen	1:10.000 (2,5 % MM/TBST)	Sigma-Aldrich
Ziege anti-Maus	1:10.000 (2,5 % MM/TBST)	Sigma-Aldrich

## 2.6 Immunohistochemie zur histomorphologischen Darstellung von SOCS3

### 2.6.1 Anfertigung der Gewebeschnitte

Die auf Trockeneis mit sterilen Einwegskalpellenschnittenen Gewebestücke wurden in Tissue-Tek Kryogefäße gegeben und in Tissue-Tek Kryomedium eingebettet, darin Lagerung bei -20 °C. Die Anfertigung der Kryoschnitte erfolgte am Kryotom. Es wurden von jeder Probe 20 Schnitte in einer Dicke von 7 µm angefertigt. Jeweils zwei bis drei Schnitte wurden auf einen Objektträger nebeneinander positioniert. Die Objektträger mit den feuchten Gewebeschnitten wurden bei Raumtemperatur getrocknet. Danach wurden sie bis zur weiteren Verwendung in Kunststoff-Aufbewahrungs-Boxen bei -20 °C gelagert.

Zu Beginn führten wir die immunohistochemischen Färbungen mit ausgewählten Präparaten und verschiedenen Konzentrationen des SOCS3-Antikörpers durch, um die geeignete Konzentration für die weiteren Färbungen herauszufinden. Hierzu stellten wir Konzentrationen von 1:200, 1:400, 1:800 und 1:1000 her. Die Präparate mit der 1:200 Verdünnung stellten sich am besten dar, sodass wir in den weiteren Versuchen diese Konzentration verwendeten.

#### Primärer Antikörper:

SOCS3	sc-9023	Santa Cruz
-------	---------	------------

#### Sekundärer Antikörper:

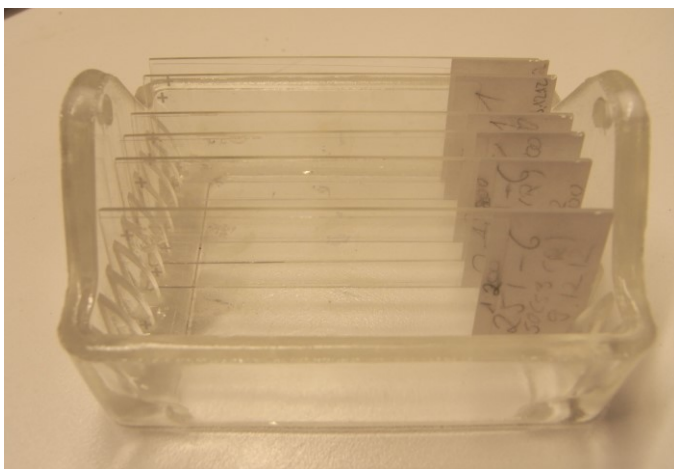
Ziege anti-Kaninchen	sc-2014	Santa Cruz
----------------------	---------	------------

### 2.6.2 Durchführung

Zu Beginn fixierten wir die Objektträger für 10 Minuten in kaltem Aceton bei -20 °C. Anschließend folgte 3 x 5 Minuten Waschen in PBS. Vor erneutem Waschen in PBS erfolgte das Blockieren der endogenen Peroxidase mit 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (verdünnt in PBS) für 10 Minuten.

Für die kommenden Inkubationen wurde mit einem Fettstift ein Kreis um die jeweiligen Gewebeschnitte gezogen, damit die Lösungen tropfenförmig das Gewebestück benetzten. Darauf folgte eine Inkubation mit dem Avidin/Biotin-Blocking Kit nach

Angaben des Herstellers, danach jeweils erneutes Waschen in PBS. Es erfolgte das Blockieren mit 20  $\mu$ l der Blocking-Lösung, bestehend aus Blocking Reagent in PBS sowie dem Serum des 2. Antikörpers für 60 Minuten bei Raumtemperatur. Diese Lösung wurde nach der Inkubation vorsichtig mit einer Pipette abgezogen. Nun wurden je 20  $\mu$ l des 1. Antikörpers, 1:200 in Blocking-Lösung verdünnt, hinzugegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Auch für die immunohistochemischen Untersuchungen sind Negativkontrollen notwendig. Sie wurden angefertigt, indem auf einen Objektträger der Versuchsreihe die Blockinglösungen gegeben wurden, jedoch ohne Hinzugabe des 1. Antikörpers.



**Abb. 2.6.2: Immunohistochemie.**

Die Abbildung zeigt mehrere Objektträger aus Glas, die in einem Sammelgefäß eingebettet sind. Rechts sind die Beschriftungsfelder sichtbar. Dieses Trägerglas kann in mit PBS gefüllte Kunststoffgefäße gegeben werden für die folgenden Waschgänge.

Am Folgetag wurde die Lösung, die den 1. Antikörper enthält, vorsichtig mit einer Pipette abgesaugt. Es erfolgten Waschgänge 3 x 5 Minuten in PBS. Währenddessen wurde der 2. Antikörper mit Blocking-Lösung in 1:200 Verdünnung angesetzt. Auf die Gewebestücke als auch auf die Negativkontrolle wurden je 20  $\mu$ l des 2. Antikörpers gegeben und für 60 Minuten inkubiert. Währenddessen erfolgte die Vorbereitung des AB-Komplex (Avidin/Biotin-Komplex). Es wurden in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß jeweils 20  $\mu$ l von Komplex A und Komplex B pipettiert, zudem 1 ml PBS. Diese Mischung wurde manuell durchpipettiert und kurz gevortext, woran sich die Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur schloss. Die Objektträger wurden nach Inkubation mit dem 2. Antikörper 3 x 5 Minuten in PBS gewaschen. Anschließend wurden je 30  $\mu$ l des AB-Komplex auf je ein Gewebestück pipettiert und bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Danach erfolgten erneute Waschgänge 2 x 5 Minuten in PBS und 1 x 5 Minuten in dH<sub>2</sub>O. Das Substrat (HRP-Substrat von Sigma, horseradish peroxidase) wurde nach Angaben des Herstellers vorbereitet, indem je 1 Tablette in 1 ml ddH<sub>2</sub>O

aufgelöst wurde. Von dem HRP-Substrat wurde je 1 Tropfen auf jedes Gewebestück gegeben, nach 10 Sekunden wurde die Reaktion durch Waschen in PBS gestoppt.

Der AB-Komplex enthält ein gebundenes Enzym. Es findet nach Hinzugabe des Substrates eine chemische Reaktion statt, bei der ein sichtbarer, bräunlicher Farbstoff entsteht.

Abschließend wurden die Gewebestücke mit Aquatex fixiert. Zur Auswertung mikroskopierten wir die Objektträger am Lichtmikroskop.

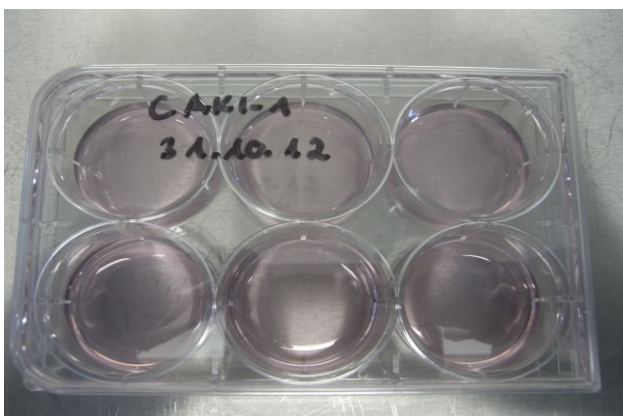
10 x PBS:

80 g NaCl
2 g KCl
14,45 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{xH}_2\text{O}$
2 g $\text{KH}_2\text{PO}_4$

## 2.7 Zellkulturversuche

### 2.7.1 Zellstimulationsversuch mit Caki-1-Zellen und Messung von SOCS3 mittels Realtime TaqMan-PCR

Die in den 6-well-Platten ausgesäten Caki-1-Zellen wurden je 30 Minuten mit 1 ng, 10 ng und 100 ng IL-6 oder IFN- $\gamma$  bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  stimuliert. Die Stimulationsversuche wurden je dreimal durchgeführt. Danach wurden die Zellen mit Trizol abgelöst und die RNA nach der unter 2.4.2 beschriebenen Methode extrahiert. Daran schlossen sich die Schritte von 2.4.5 zur Herstellung der cDNA zur Vorbereitung für die TaqMan-PCR an. Schließlich erfolgte die Messung der SOCS3-mRNA-Expression mittels Realtime TaqMan-PCR relativ zur RPL-P0.



**Abb. 2.7.1.1: Zellstimulation in 6-well-Platten.** Die Abbildung zeigt eine Kunststoffplatte mit 6 kreisrunden Vertiefungen (Well). Darin sind jeweils  $6 \times 10^6$  Caki-1-Zellen ausgesät und mit Zellkulturmedium bedeckt. Zur Stimulation wurde jeweils das Stimulanz in entsprechender Konzentration in eine der Vertiefungen gegeben.

## 2.8 Statistik

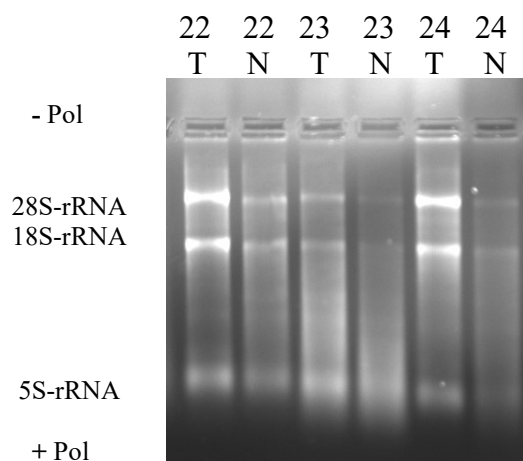
Die statistische Analyse sowie die Graphiken wurden mit der GraphPad Prism 5.02 Software (GraphPad Software, Inc.) erstellt. Da jeweils T und N von einem Patienten vorlagen wurde ein gepaarter Test zur statistischen Berechnung herangezogen. Da keine Gauss'sche Normalverteilung vorlag wurde ein nicht-parametrischer gepaarter Test, der gepaarte Wilcoxon-Test, zum Vergleich von Tumor und gesundem Gewebe verwendet. Die Spearman-Korrelationskoeffizient-Analyse wurde zur Berechnung der Korrelation zwischen zwei Variablen eines Individuums verwendet. Es ergibt sich ein Korrelationskoeffizient  $r$ , der zwischen -1 und +1 liegt, und ein p-Wert. Als signifikant wurden Ergebnisse gewertet, deren p-Wert  $\leq 0,05$  ist. Der Korrelationskoeffizient gibt Stärke und Richtung des Zusammenhangs an. Bei  $r = -1$  besteht ein stark negativer Zusammenhang zwischen zwei Variablen, bei  $r = +1$  besteht ein stark positiver Zusammenhang. Bei  $r = 0$  besteht kein Zusammenhang. Die angegebenen Ergebnisse wurden als Mediane mit dem Interquartilbereich (25-75 %) dargestellt. In den Graphiken steht \* für  $p \leq 0,05$ , \*\* für  $p < 0,01$  und \*\*\* für  $p < 0,001$ .

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 RNA-Gelelektrophorese

Um die Qualität der RNA beurteilen zu können, wurde eine RNA-Gelelektrophorese durchgeführt. Die drei Banden der eukaryotischen ribosomalen RNA sind bei guter Qualität deutlich zu sehen und voneinander abzugrenzen.

Gewebeproben, deren RNA im Tumor- oder im Normalgewebe nicht intakt und mit den drei Banden darstellbar war, wurden aus der Studie ausgeschlossen.



**Abb. 3.1.1: RNA-Gelelektrophorese.** Ausschnitt eines RNA-Gels, detektiert mit UV-Licht, mit den Beispielproben der Patienten 22, 23 und 24. Die drei Banden der eukaryotischen ribosomalen RNA sind als helle Streifen sichtbar. Am Minuspol sind die Taschen im Gel zu sehen, in welche das Material hinein pipettiert wurde. Die RNA ist insgesamt negativ geladen und bewegt sich in einem elektrischen Feld zum Pluspol. Je kleiner das rRNA-Fragment ist, umso schneller wandert es durch das Gel Richtung Pluspol. Es findet somit eine Auftrennung der rRNA-Fragmente statt, nahe am Minuspol befindet sich die 28S-rRNA, Richtung Pluspol folgt die 18S-rRNA und am weitesten gewandert ist die kleinste rRNA, die 5S-rRNA.

#### 3.2 Genexpression der Carboanhydrase-IX (CA-IX) signifikant erhöht im Nierenzellkarzinomgewebe

Vorangegangene Arbeiten konnten zeigen, dass die CA-IX im klarzelligen Nierenzellkarzinom erhöht ist (Murakami, Kanda et al. 1999). Es ist ein über HIF-1 $\alpha$  reguliertes transmembranes Protein, das in mehr als 90 % der klarzelligen

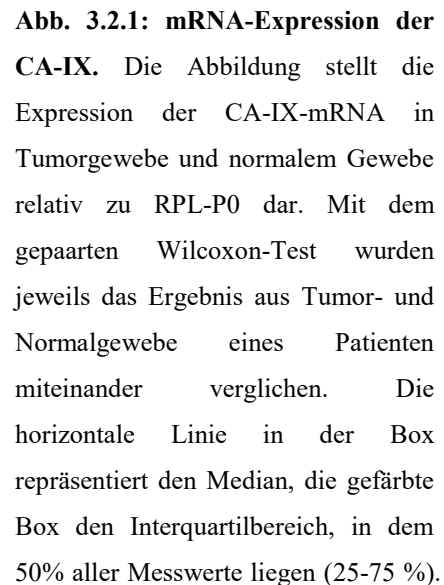
**CAIX mRNA**

Relative mRNA Expression

Tumor Normal

\*\*\*

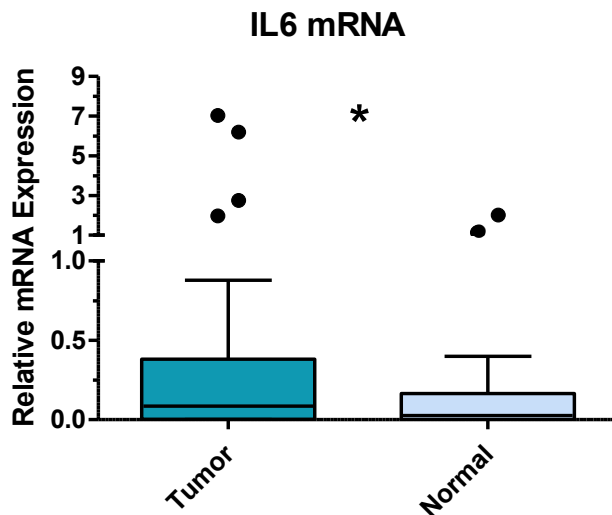
Group	Relative mRNA Expression (approximate values)
Tumor	0.5, 1, 1.5, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 12, 14, 28, 32, 35
Normal	0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3.0, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4.0, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 5.0, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7.0, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 8.0, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 8.5, 8.6, 8.7, 8.8, 8.9, 9.0, 9.1, 9.2, 9.3, 9.4, 9.5, 9.6, 9.7, 9.8, 9.9, 10.0, 10.1, 10.2, 10.3, 10.4, 10.5, 10.6, 10.7, 10.8, 10.9, 11.0, 11.1, 11.2, 11.3, 11.4, 11.5, 11.6, 11.7, 11.8, 11.9, 12.0, 12.1, 12.2, 12.3, 12.4, 12.5, 12.6, 12.7, 12.8, 12.9, 13.0, 13.1, 13.2, 13.3, 13.4, 13.5, 13.6, 13.7, 13.8, 13.9, 14.0, 14.1, 14.2, 14.3, 14.4, 14.5, 14.6, 14.7, 14.8, 14.9, 15.0, 15.1, 15.2, 15.3, 15.4, 15.5, 15.6, 15.7, 15.8, 15.9, 16.0, 16.1, 16.2, 16.3, 16.4, 16.5, 16.6, 16.7, 16.8, 16.9, 17.0, 17.1, 17.2, 17.3, 17.4, 17.5, 17.6, 17.7, 17.8, 17.9, 18.0, 18.1, 18.2, 18.3, 18.4, 18.5, 18.6, 18.7, 18.8, 18.9, 19.0, 19.1, 19.2, 19.3, 19.4, 19.5, 19.6, 19.7, 19.8, 19.9, 20.0, 20.1, 20.2, 20.3, 20.4, 20.5, 20.6, 20.7, 20.8, 20.9, 21.0, 21.1, 21.2, 21.3, 21.4, 21.5, 21.6, 21.7, 21.8, 21.9, 22.0, 22.1, 22.2, 22.3, 22.4, 22.5, 22.6, 22.7, 22.8, 22.9, 23.0, 23.1, 23.2, 23.3, 23.4, 23.5, 23.6, 23.7, 23.8, 23.9, 24.0, 24.1, 24.2, 24.3, 24.4, 24.5, 24.6, 24.7, 24.8, 24.9, 25.0, 25.1, 25.2, 25.3, 25.4, 25.5, 25.6, 25.7, 25.8, 25.9, 26.0, 26.1, 26.2, 26.3, 26.4, 26.5, 26.6, 26.7, 26.8, 26.9, 27.0, 27.1, 27.2, 27.3, 27.4, 27.5, 27.6, 27.7, 27.8, 27.9, 28.0, 28.1, 28.2, 28.3, 28.4, 28.5, 28.6, 28.7, 28.8, 28.9, 29.0, 29.1, 29.2, 29.3, 29.4, 29.5, 29.6, 29.7, 29.8, 29.9, 30.0, 30.1, 30.2, 30.3, 30.4, 30.5, 30.6, 30.7, 30.8, 30.9, 31.0, 31.1, 31.2, 31.3, 31.4, 31.5, 31.6, 31.7, 31.8, 31.9, 32.0, 32.1, 32.2, 32.3, 32.4, 32.5, 32.6, 32.7, 32.8, 32.9, 33.0, 33.1, 33.2, 33.3, 33.4, 33.5, 33.6, 33.7, 33.8, 33.9, 34.0, 34.1, 34.2, 34.3, 34.4, 34.5, 34.6, 34.7, 34.8, 34.9, 35.0, 35.1, 35.2, 35.3, 35.4, 35.5, 35.6, 35.7, 35.8, 35.9, 36.0, 36.1, 36.2, 36.3, 36.4, 36.5, 36.6, 36.7, 36.8, 36.9, 37.0, 37.1, 37.2, 37.3, 37.4, 37.5, 37.6, 37.7, 37.8, 37.9, 38.0, 38.1, 38.2, 38.3, 38.4, 38.5, 38.6, 38.7, 38.8, 38.9, 39.0, 39.1, 39.2, 39.3, 39.4, 39.5, 39.6, 39.7, 39.8, 39.9, 40.0, 40.1, 40.2, 40.3, 40.4, 40.5, 40.6, 40.7, 40.8, 40.9, 41.0, 41.1, 41.2, 41.3, 41.4, 41.5, 41.6, 41.7, 41.8, 41.9, 42.0, 42.1, 42.2, 42.3, 42.4, 42.5, 42.6, 42.7, 42.8, 42.9, 43.0, 43.1, 43.2, 43.3, 43.4, 43.5, 43.6, 43.7, 43.8, 43.9, 44.0, 44.1, 44.2, 44.3, 44.4, 44.5, 44.6, 44.7, 44.8, 44.9, 45.0, 45.1, 45.2, 45.3, 45.4, 45.5, 45.6, 45.7, 45.8, 45.9, 46.0, 46.1, 46.2, 46.3, 46.4, 46.5, 46.6, 46.7, 46.8, 46.9, 47.0, 47.1, 47.2, 47.3, 47.4, 47.5, 47.6, 47.7, 47.8, 47.9, 48.0, 48.1, 48.2, 48.3, 48.4, 48.5, 48.6, 48.7, 48.8, 48.9, 49.0, 49.1, 49.2, 49.3, 49.4, 49.5, 49.6, 49.7, 49.8, 49.9, 50.0, 50.1, 50.2, 50.3, 50.4, 50.5, 50.6, 50.7, 50.8, 50.9, 51.0, 51.1, 51.2, 51.3, 51.4, 51.5, 51.6, 51.7, 51.8, 51.9, 52.0, 52.1, 52.2, 52.3, 52.4, 52.5, 52.6, 52.7, 52.8, 52.9, 53.0, 53.1, 53.2, 53.3, 53.4, 53.5, 53.6, 53.7, 53.8, 53.9, 54.0, 54.1, 54.2, 54.3, 54.4, 54.5, 54.6, 54.7, 54.8, 54.9, 55.0, 55.1, 55.2, 55.3, 55.4, 55.5, 55.6, 55.7, 55.8, 55.9, 56.0, 56.1, 56.2, 56.3, 56.4, 56.5, 56.6, 56.7, 56.8, 56.9, 57.0, 57.1, 57.2, 57.3, 57.4, 57.5, 57.6, 57.7, 57.8, 57.9, 58.0, 58.1, 58.2, 58.3, 58.4, 58.5, 58.6, 58.7, 58.8, 58.9, 59.0, 59.1, 59.2, 59.3, 59.4, 59.5, 59.6, 59.7, 59.8, 59.9, 60.0, 60.1, 60.2, 60.3, 60.4, 60.5, 60.6, 60.7, 60.8, 60.9, 61.0, 61.1, 61.2, 61.3, 61.4, 61.5, 61.6, 61.7, 61.8, 61.9, 62.0, 62.1, 62.2, 62.3, 62.4, 62.5, 62.6, 62.7, 62.8, 62.9, 63.0, 63.1, 63.2, 63.3, 63.4, 63.5, 63.6, 63.7, 63.8, 63.9, 64.0, 64.1, 64.2, 64.3, 64.4, 64.5, 64.6, 64.7, 64.8, 64.9, 65.0, 65.1, 65.2, 65.3, 65.4, 65.5, 65.6, 65.7, 65.8,



### 3.3 Genexpression von IL-6 signifikant erhöht im Nierenzellkarzinomgewebe

Im Folgenden wurde die IL-6-Genexpression durch die Realtime TaqMan-PCR untersucht. IL-6 ist ein Marker der Inflammation. Es ist des Weiteren bekannt, dass IL-6 über den STAT3-Signalweg zu einer Metastasierung im klarzelligen Nierenzellkarzinom führt (Kaminska, Czarnecka et al. 2015). Die IL-6-Genexpression wurde relativ zu RPL-P0 gemessen. In *Abb. 3.3.1* ist das Ergebnis veranschaulicht. IL-6-mRNA ist in den Tumorgewebe signifikant erhöht gegenüber dem benachbarten Normalgewebe.





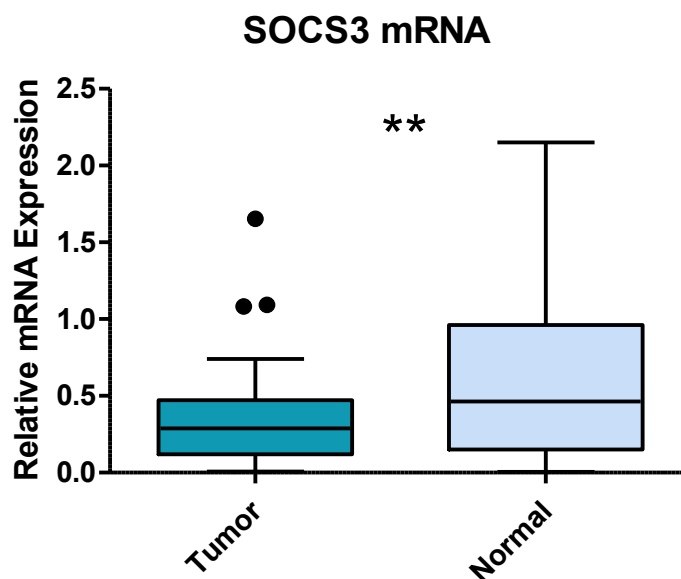
**Abb. 3.3.1: mRNA-Expression von IL-6.** Die Abbildung zeigt die Expression der IL-6-mRNA im Tumorgewebe und Normalgewebe von  $n = 30$  Patienten. Auf der Y-Achse ist die relative mRNA-Expression gegenüber der Expression von RPL-P0 aufgetragen. Zum Vergleichen des jeweiligen Gewebes eines Patienten diente der gepaarte Wilcoxon-Test. Die horizontale Linie in den Boxen repräsentiert den Median, die gefärbten Boxen geben den

Interquartilbereich an, in dem 50 % aller Messwerte liegen (25-75 %). Die horizontalen Linien ober- und unterhalb der Box begrenzen die 10. und 90. Perzentile. Stark abweichende Werte sind als Punkte dargestellt. Der Median im Tumorgewebe liegt bei 0,085, der Median im gesunden Gewebe bei 0,026. Mit  $p = 0,046$  ist das Ergebnis signifikant.

### 3.4 Die SOCS3-Genexpression im Nierenzellkarzinomgewebe und Normalgewebe

Die SOCS3-mRNA konnte per Realtime TaqMan-PCR sowohl in Tumorgewebe als auch in gesundem Gewebe detektiert werden, SOCS3 ist somit in beiden Geweben konstitutiv exprimiert. Im Tumorgewebe ist die Expression relativ zu RPL-P0 gegenüber dem gesunden Gewebe allerdings signifikant vermindert (*s. Abb. 3.4.1*).

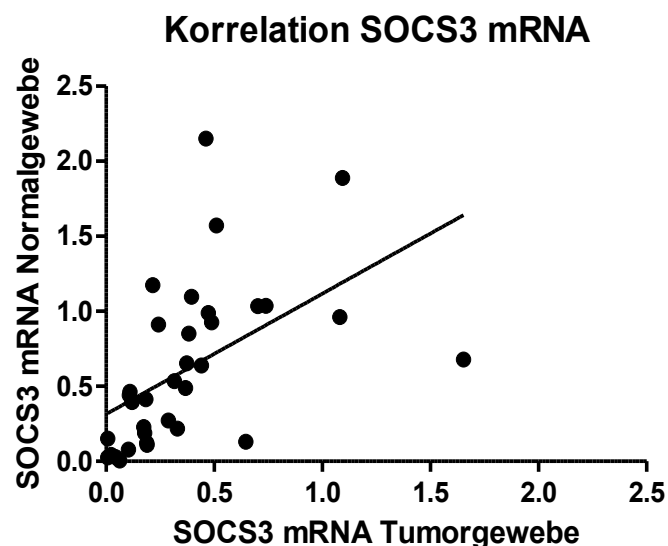
**Abb. 3.4.1: Die mRNA-Expression von SOCS3.** Die Abbildung stellt die Expression der SOCS3-mRNA relativ zu RPL-P0 im Normalgewebe und im Tumorgewebe dar. Es wurden  $n = 35$  Patienten untersucht. Der gepaarte Wilcoxon-Test wurde angewendet. Die horizontale Linie in den Boxen repräsentiert den Median, die gefärbten Boxen



den Interquartilbereich (25-75 %). Die horizontalen Linien ober- und unterhalb der Box begrenzen die 10. und 90. Perzentile. Stark abweichende Werte sind als Punkte dargestellt. Mit  $p = 0,0016$  ist das Ergebnis signifikant.

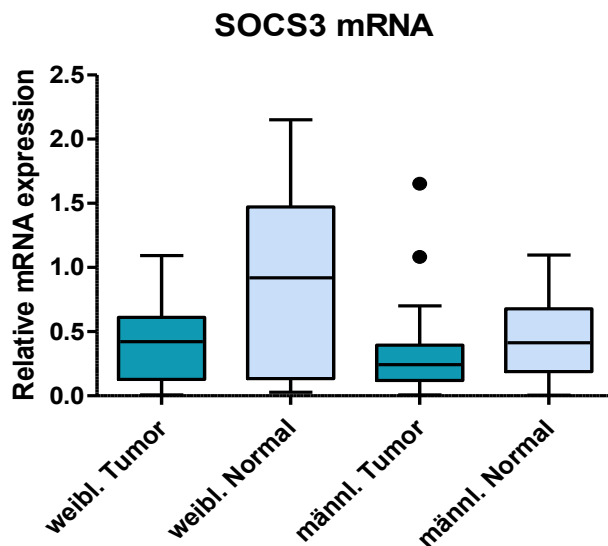
Darüber hinaus wurde der Zusammenhang zwischen der Expressionshöhe der SOCS3-mRNA relativ zu RPL-P0 im Tumorgewebe mit der Expression im zugehörigen gesunden Gewebe verglichen. Die Berechnung erfolgte mit der Spearman Korrelations-Analyse. Der Korrelationskoeffizient ist mit  $r = 0,7571$  positiv, es besteht damit ein starker positiver Zusammenhang zwischen der SOCS3-Genexpression im Tumorgewebe und der Expression im benachbarten Normalgewebe. Das Ergebnis ist in einem Streudiagramm in *Abb. 3.4.2* dargestellt.

**Abb. 3.4.2: Streudiagramm zu der Korrelation der SOCS3-Genexpression zwischen Tumor- und Normalgewebe.** Die Graphik gibt die Korrelation zwischen der SOCS3-Genexpression relativ zu RPL-P0 im Tumorgewebe und dem zugehörigen benachbarten Normalgewebe wieder. Auf der X-Achse ist die relative SOCS3-Expression im Tumorgewebe aufgetragen. Auf der Y-Achse ist die relative SOCS3-Expression im Normalgewebe gezeigt. Die Punkte



stellen jeweils einen Patienten dar. Es wurden  $n = 35$  Patienten einbezogen. Der Spearman's Korrelationskoeffizient beträgt  $r = 0,7571$ , es besteht damit eine positive Korrelation. Das Ergebnis ist mit  $p = 0,001$  signifikant.

Beim Vergleich der relativen SOCS3-Genexpression zwischen männlichen und weiblichen Patienten ist zu erkennen, dass die weiblichen Patienten insgesamt höhere SOCS3-Genexpressionen sowohl im Tumor- als auch im Normalgewebe aufweisen (*s. Abb. 3.4.3*). Zu berücksichtigen sind jedoch teilweise starke Schwankungen, insbesondere innerhalb des Normalgewebes der weiblichen Patienten.

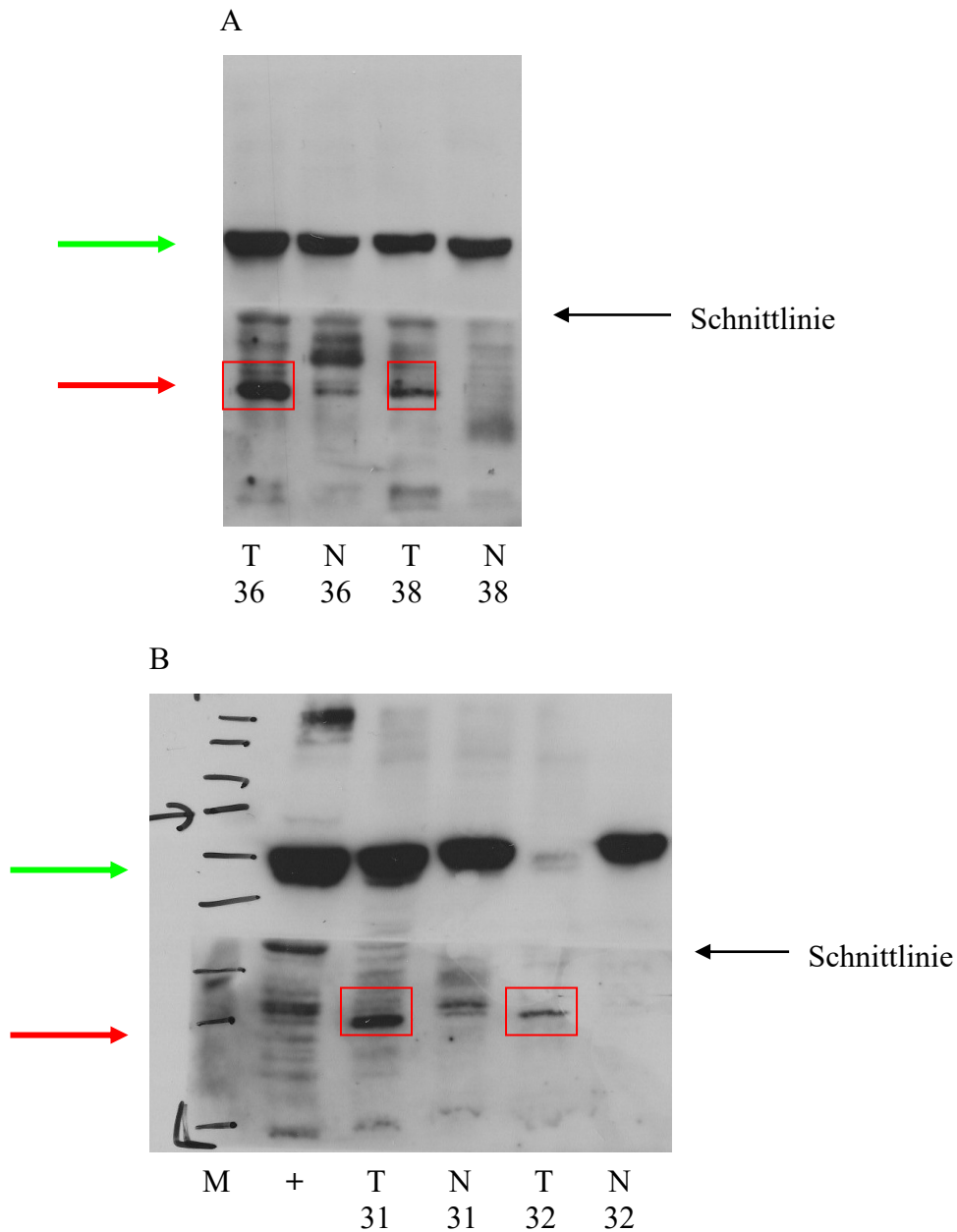


**Abb. 3.4.3: Relative SOCS3-Genexpression bei Frauen und Männern im Tumor- und Normalgewebe.** Die Abbildung zeigt 4 Box Plots, jeweils männliche und weibliche Patienten, Tumor und Normalgewebe. Auf der Y-Achse ist die SOCS3-mRNA-Expression relativ zu RPL-P0 aufgetragen. Die horizontalen Linien repräsentieren die Mediane, die farbigen Boxen geben den Interquartilbereich an, in dem sich 25-75 % der Messwerte befinden. Die

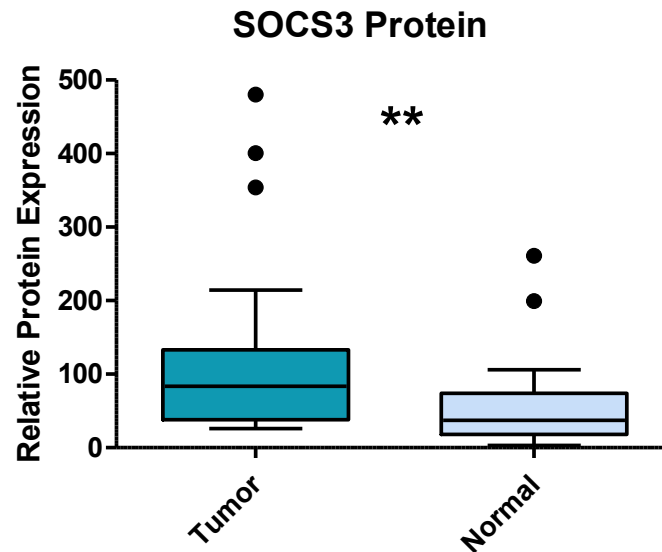
horizontalen Linien ober- und unterhalb der Boxen entsprechen der 10. und 90. Perzentile. Einzelne stark abweichende Werte sind als Punkte dargestellt. Es wurden  $n = 12$  weibliche Patienten und  $n = 23$  männliche Patienten einbezogen. Der Median liegt bei den weiblichen Patienten im Tumorgewebe bei 0,422, im Normalgewebe bei 0,920. Bei den männlichen Patienten im Tumorgewebe bei 0,243, im Normalgewebe bei 0,414. Der Unterschied ist jeweils nicht signifikant.

### 3.5 Die SOCS3-Proteinexpression im Nierenzellkarzinomgewebe und Normalgewebe

Nach Durchführung der Untersuchungen zur SOCS3-Genexpression wurde die Proteinebene untersucht. Zur Berechnung der relativen Proteinexpression wurde  $\beta$ -Tubulin herangezogen, welches ubiquitär in den Geweben vorhanden ist. Es stellte sich eine signifikante Erhöhung des SOCS3-Proteins im Tumorgewebe gegenüber dem Normalgewebe dar (*s. Abb 3.5.1*). Die Membranen wurden bei 35 kD geschnitten und jeweils mit verschiedenen Substraten inkubiert, was die unterschiedliche Kontrastierung erklärt. Es wurden insgesamt Westernblots von  $n = 22$  Patienten durchgeführt und in die Auswertung einbezogen. Die Proteinexpression von SOCS3 relativ zu  $\beta$ -Tubulin wurde nach Digitalisierung der Banden mit ImageJ ausgewertet und die statistische Signifikanz mit dem gepaarten Wilcoxon-Test berechnet (*s. Abb. 3.5.2*).



**Abb. 3.5.1 A und B: Westernblots von SOCS3 und  $\beta$ -Tubulin.** Hier dargestellt exemplarische Beispiele von Westernblots mit Detektion von SOCS3 und  $\beta$ -Tubulin der Patienten Nr. 36 und 38 (Bild A) sowie Nr. 31 und 32 (Bild B). Die SOCS3-Bande (roter Pfeil und rotes Kästchen) liegt bei 23 kD, die  $\beta$ -Tubulinbande (grüner Pfeil) bei 55 kD. Die geschnittenen Membranen wurden jeweils mit anderen Chemolumineszenz-Detektions-Lösungen behandelt. M = Marker. Das Plus entspricht der aufgetragenen Positivkontrolle, hergestellt aus der Zellreihe A549 durch IL-22-Stimulation. Der schwarze Pfeil in Bild B entspricht der Höhe der 70 kD-Bande des Markers. Die Schnittlinie zeigt die Grenze der zwei Membranen.

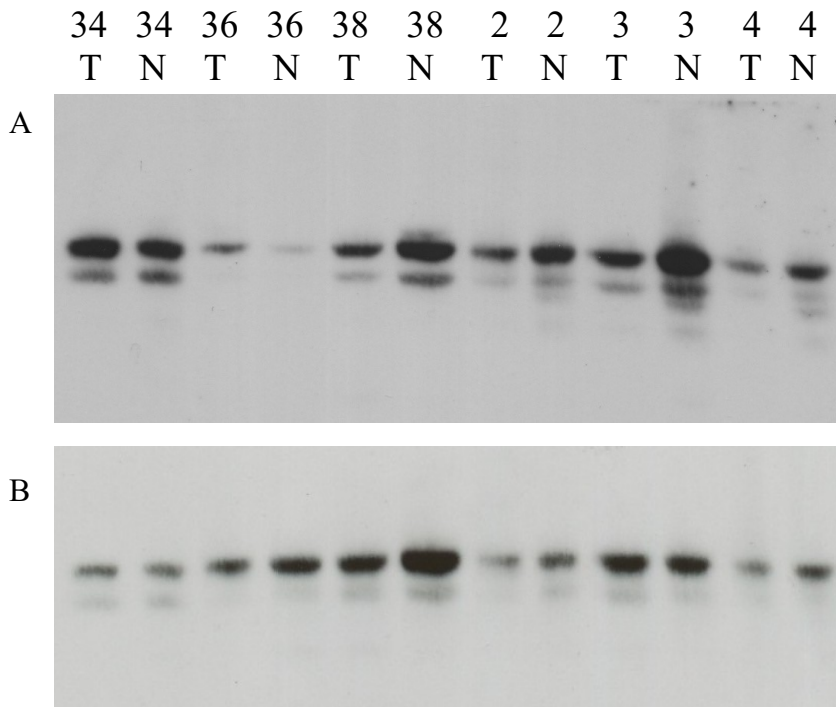


**Abb. 3.5.2: SOCS3 auf Proteinebene.** Die Abbildung zeigt das Ergebnis der Westernblots von SOCS3 relativ zu  $\beta$ -Tubulin im Tumorgewebe gegenüber dem Normalgewebe. Angewendet wurde der gepaarte Wilcoxon-Test. Auf der Y-Achse ist die relative Proteinexpression gegenüber  $\beta$ -Tubulin aufgetragen. Auf der X-Achse jeweils ein Boxplot-Diagramm von Tumorgewebe und Normalgewebe. Die horizontale Linie zeigt den Median, die farbigen Boxen begrenzen den Interquartilbereich, in dem 50 % aller Messwerte liegen (25-75 %). Die horizontalen Linien ober- und unterhalb der Boxen entsprechen der 10. und 90. Perzentile. Stark abweichende Werte sind als Punkte dargestellt. Es wurden  $n = 22$  Patienten ausgewertet. Der Median im Tumorgewebe liegt bei 83,380, der Median im Normalgewebe bei 37,130. Mit  $p = 0,0018$  ist der Unterschied signifikant. Das SOCS3-Protein ist im Tumorgewebe höher exprimiert als im benachbarten Normalgewebe.

### 3.6 Die Proteinexpression von pSTAT3 und tSTAT3 im Nierenzellkarzinomgewebe und Normalgewebe

Da SOCS3 ein negativer Regulator des onkogenen STAT3 ist, wurde ebenfalls die Proteinexpression des aktiven STAT3 (pSTAT3) untersucht. Die Expression von pSTAT wurde relativ zum gesamten STAT3 (tSTAT3) ausgewertet. Da beide STAT3-Proteine das selbe Molekulargewicht besitzen, wurde die Membran nach Inkubation mit pSTAT3 mit Natriumbicarbonat gestrippt, sodass sich der pSTAT3-Antikörper ablöste. Darauf folgte die Inkubation mit dem tSTAT3-Antikörper. Das Ergebnis zeigte bei einigen Patienten eine höhere pSTAT3-Proteinexpression im Normalgewebe gegenüber dem Tumorgewebe, bei anderen hingegen stellte sich eine höhere pSTAT3-Proteinexpression im Tumorgewebe gegenüber dem Normalgewebe dar. Die Ergebnisse

des Westernblots bezüglich pSTAT3 relativ zu tSTAT3 sind somit nicht eindeutig. Beispielhaft sind Westernblotanalysen von 6 Patienten in *Abb. 3.6.1 A und B* dargestellt.



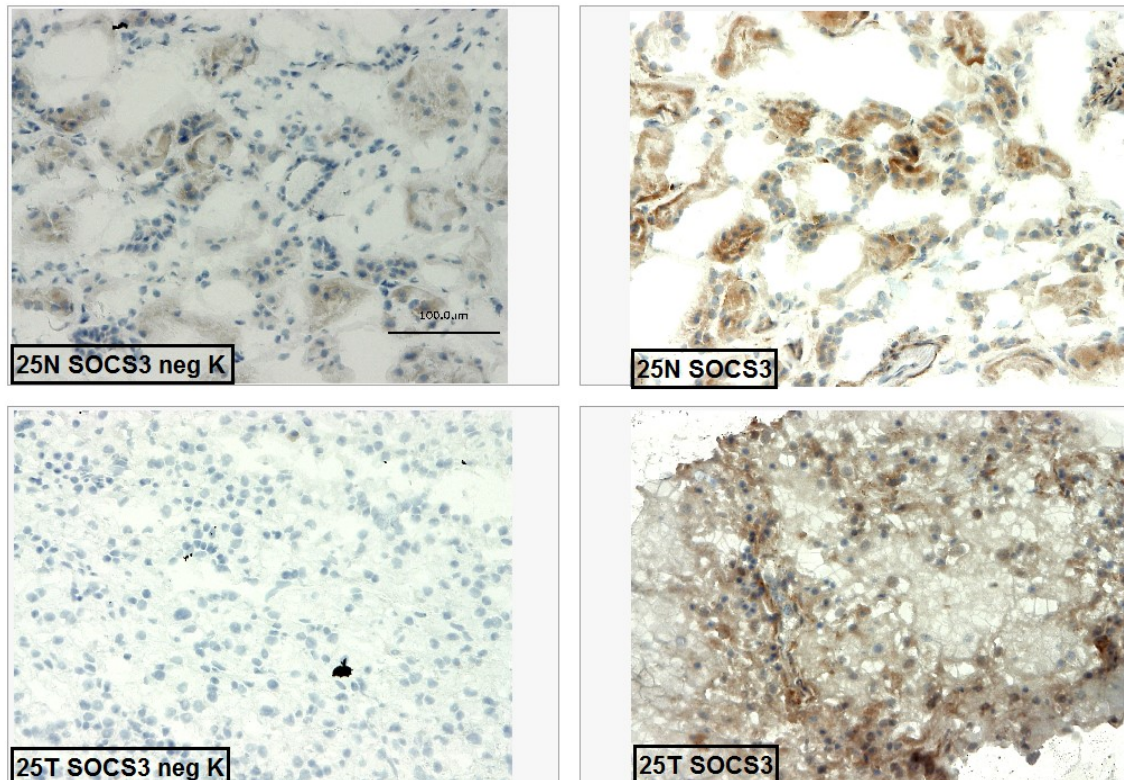
**Abb. 3.6.1 A und B: Westernblots von pSTAT3 und tSTAT3.** Die Abbildung zeigt Westernblotanalysen von 6 Patienten, Nr. 34, 36, 38, 2, 3 und 4, jeweils Tumorgewebe (T) und Normalgewebe (N) nebeneinander aufgetragen. Bild A zeigt die Banden von pSTAT3 mit der typischen Doppelbande. Diese kommt zustande, da pSTAT3 in zwei Untereinheiten vorliegt, STAT3 $\alpha$  mit 86 kD und STAT3 $\beta$  mit 79 kD. Die breitere Bande entspricht dem größeren Protein, STAT3 $\alpha$ . Bild B zeigt die selbe Membran nach Inkubation mit dem tSTAT3-Antikörper.

Anhand dieser Beispiele lässt sich darstellen, dass in einigen Proben pSTAT3 im Normalgewebe relativ erhöht ist gegenüber dem Tumorgewebe, z.B. Probe Nr. 3. In einigen anderen Proben, z.B. Probe Nr. 36, ist pSTAT3 im Tumorgewebe gegenüber dem Normalgewebe relativ höher exprimiert.

### 3.7 Immunohistochemische Darstellung von SOCS3 in Nierenzellkarzinomgewebe und Normalgewebe

Mit der Immunohistochemie sollte das Ergebnis aus den Westernblots, die Erhöhung von SOCS3 auf Proteinebene im Tumorgewebe gegenüber dem Normalgewebe nachvollzogen werden. In den Gewebeschnitten zeigte sich eine starke Hintergrundaktivität. Die histologischen Schnitte in *Abb. 3.7.1* zeigen das Tumor- und

Normalgewebe des Patienten Nr. 25. Das SOCS3-Protein konnte sowohl im Tumor- als auch im Normalgewebe dargestellt werden, die SOCS3-positiven Zellen erscheinen bräunlich. Die korrespondierenden Negativkontrollen zeigten keine, beziehungsweise eine verminderte bräunliche Hintergrundfärbung. Ein Vergleich der SOCS3-Expression zwischen Tumor- und Normalgewebe gelang lichtmikroskopisch nicht, da sich die Morphologie und die Zelldichte der beiden Gewebe stark unterschieden.



**Abb. 3.7.1: SOCS3-Immunohistochemie aus Tumor- und Normalgewebe.** Darstellung von Gewebeproben des Patienten Nr. 25 am Lichtmikroskop in 400-facher Vergrößerung. Die beiden oberen Abbildungen zeigen das dem Tumor benachbarte Normalgewebe des Patienten Nr. 25. Links die Negativkontrolle, rechts davon nach Inkubation mit dem SOCS3-Antikörper und dem Sekundärantikörper. Die beiden unteren Abbildungen zeigen das Tumorgewebe desselben Patienten. Links die Negativkontrolle, rechts nach Inkubation mit dem SOCS3-Antikörper und dem Sekundärantikörper. Die braunen Bereiche entsprechen dem detektierten SOCS3-Protein.

### 3.8 Unterschiede in der SOCS3-Genexpression zwischen Tumor- und Normalgewebe persistieren im Hinblick auf die TNM-Stadien und den Grad

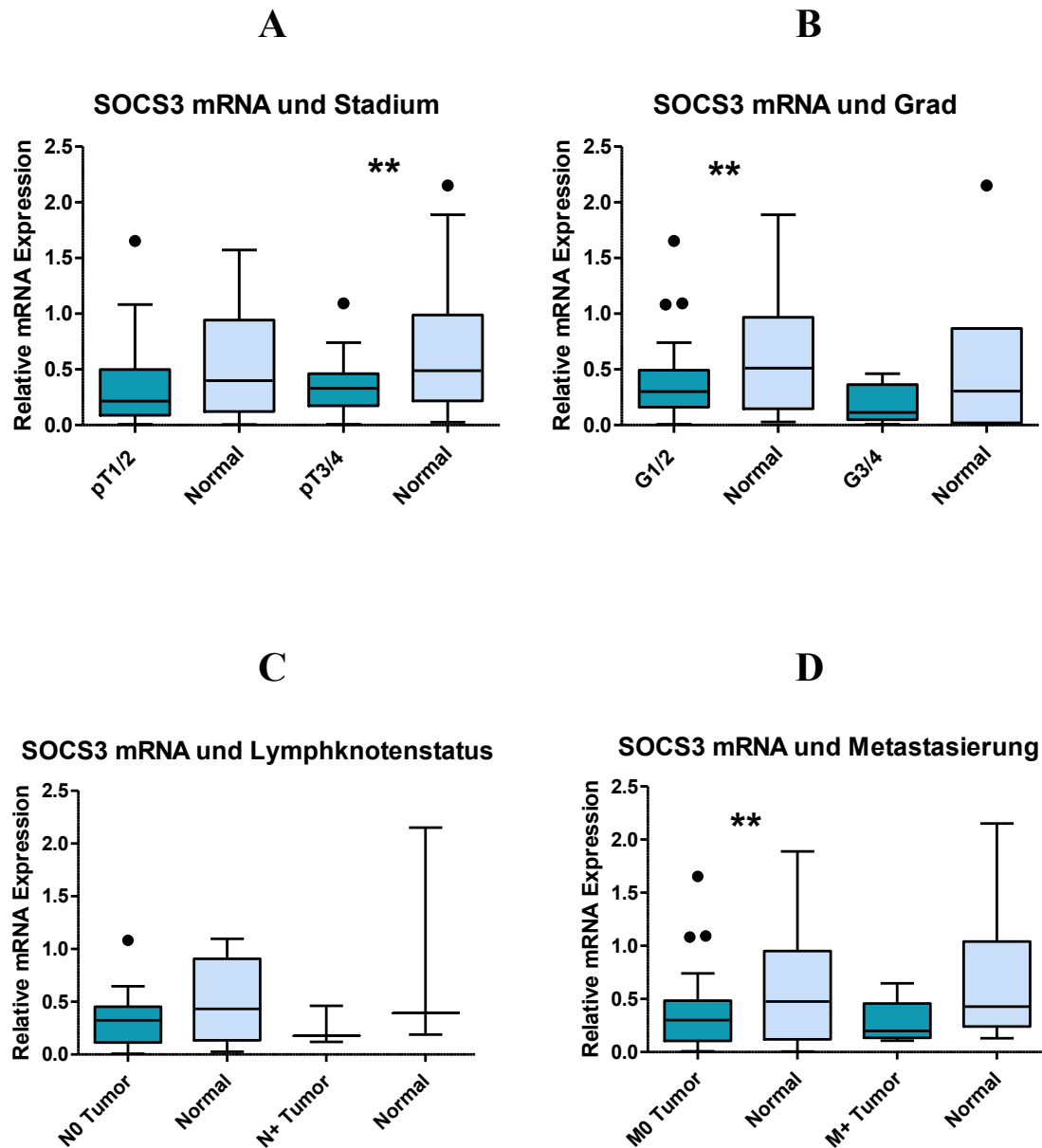
Um einen klinischen Zusammenhang der SOCS3-Genexpression mit der TNM-Klassifikation und dem Grad des Tumors festzustellen, wurden die jeweiligen Gruppen miteinander verglichen. Aufgrund der Patienten-Anzahl von  $n = 35$  wurden T1 mit T2 sowie T3 mit T4 zusammengefasst, ebenso G1 mit G2 sowie G3 mit G4. Es wurde der gepaarte Wilcoxon-Test angewendet.

In Tumorgeweben mit einer fortgeschrittenen lokalen Tumorausbreitung pT3/4 ist die SOCS3-Genexpression signifikant niedriger als in dem zugehörigen gesunden Gewebe. Bei lokal begrenzten Tumoren pT1/2 zeigte sich dieselbe Tendenz jedoch ohne Signifikanz (*s. Abb. 3.8.1 A*).

Die SOCS3-Genexpression im Tumorgewebe von G1/G2-Tumoren ist gegenüber der Expression im Normalgewebe vermindert. In G3/4-Tumoren ist das Ergebnis ähnlich, jedoch bei einer geringen Anzahl ohne Signifikanz (*s. Abb. 3.8.1 B*). Bei dem Vergleich zwischen metastatischem Lymphknotenbefall (N+) und fehlendem Lymphknotenbefall (N0) ist kein signifikanter Unterschied der SOCS3-Genexpression festzustellen. Zu beachten ist hier wiederum eine geringe Anzahl von Patienten mit N+ - Status (*s. Abb. 3.8.1 C*).

Im Hinblick auf die Fernmetastasierung lässt sich eine niedrigere SOCS3-Genexpression im Tumorgewebe bei metastasenfreien Patienten (M0) finden. Bei Patienten mit Fernmetastasen ist das Ergebnis ähnlich, jedoch nicht signifikant (*s. Abb. 3.8.1 D*).

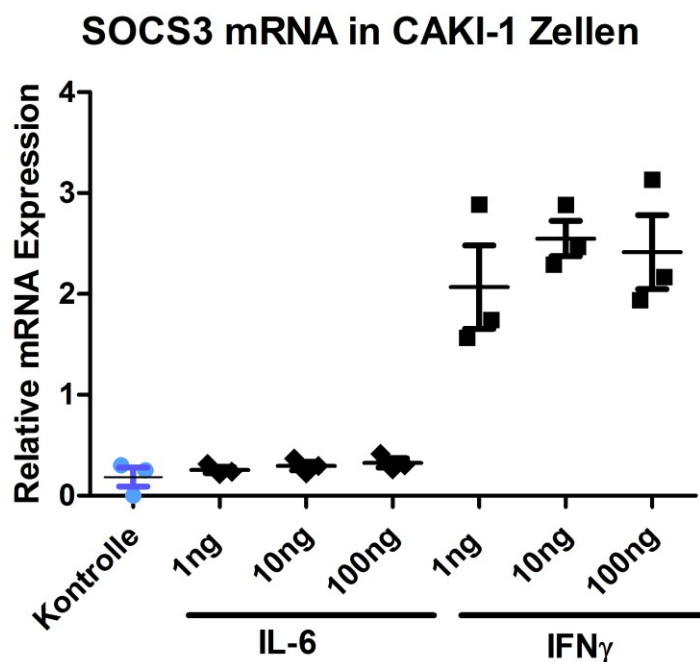




**Abb. 3.8.1 A-D: Die SOCS3-Genexpression im Tumor- und Normalgewebe in Zusammenhang mit den TNM-Stadien und dem histopathologischen Grad.** Die Abbildungen zeigen jeweils die SOCS3-Genexpression auf mRNA-Ebene in Zusammenhang mit den verschiedenen Parametern des TNM-Systems und des Grades. Angewendet wurde der gepaarte Wilcoxon-Test. Dargestellt sind Box Plots, die horizontale Linie innerhalb der farbigen Box repräsentiert den Median. Innerhalb des farbigen Bereichs befindet sich der Interquartilbereich, in dem 50 % aller Messwerte liegen (25-75 %). Die horizontalen Linien ober- und unterhalb der Boxen markieren die 10. und die 90. Perzentile. Stark abweichende Messwerte sind als Punkte dargestellt. Auf der Y-Achse ist die relative SOCS3-mRNA-Expression zu RPL-P0 aufgetragen, auf der X-Achse sind jeweils Tumor- und Normalgewebe mit den verschiedenen TNM-Stadien und dem Grad aufgetragen. **A:** pT1/2 n = 20, p = 0,0967. pT3/4 n = 15, p = 0,0015. **B:** G1/2 n = 29, p = 0,0043. G3/4 n = 6, p = 0,3125. **C:** N0 n = 16, p = 0,0591. N+ n = 3, p = 0,2500. **D:** M0 n = 27, p = 0,0091. M+ n = 8, p = 0,1094.

### 3.9 Induktion der SOCS3-Genexpression durch IFN- $\gamma$ in Caki-1-Zellen

Caki-1-Zellen wurden mit den Zytokinen IL-6 und IFN- $\gamma$  in unterschiedlichen Konzentrationen stimuliert, anschließend erfolgte die Messung der SOCS3-Genexpression mittels Realtime-TaqMan-PCR. Es zeigte sich, dass IFN- $\gamma$  unabhängig von der Konzentration die SOCS3-Genexpression induziert. Die Inkubation mit den jeweiligen Zytokinen erfolgte über 30 Minuten mit jeweils 1, 10 und 100 ng Zytokin pro ml Medium. Der Zellstimulationsversuch wurde dreimal wiederholt ( $n = 3$ ). Nach Inkubation mit IL-6 stieg die SOCS3-Genexpression nicht an. Dies war zu erwarten, da der Ko-Rezeptor von IL-6, gp130, bei der Caki-1-Zellreihe nicht vorhanden ist (Horiguchi, Oya et al. 2002). Die SOCS3-Genexpression wurde relativ zu RPL-P0 bestimmt, das Ergebnis zeigt *Abb. 3.9.1*.



**Abb. 3.9.1: SOCS3-Genexpression nach Stimulation von Caki-1-Zellen mit IL-6 und IFN- $\gamma$ .** Auf der X-Achse sind die Zytokine IFN- $\gamma$  und IL-6 in aufsteigender Konzentration aufgetragen. Auf der Y-Achse ist die SOCS3-mRNA-Expression relativ zu RPL-P0 aufgetragen. Jeder Zellstimulationsversuch wurde dreimal separat durchgeführt ( $n = 3$ ). Die Graphik zeigt, dass die SOCS3-Expression durch Stimulation mit IL-6 nicht

ansteigt. Bei der Stimulation mit IFN- $\gamma$  hingegen ließ sich ein Anstieg der SOCS3-mRNA-Expression, und zwar unabhängig von der Konzentration des Zytokins, messen. Die Kontrolle, hier in blau eingezeichnet, entspricht der unstimulierten Caki-1-Zelllinie. Die einzelnen Symbole geben jeweils die Ergebniswerte der drei Versuche pro Konzentration an. Die mittige horizontale Linie entspricht dem Mittelwert der drei Messungen.

## 4. Diskussion

### 4.1. Die Rolle von SOCS3 im klarzelligen Nierenzellkarzinom

SOCS-Proteine sind negative Regulatoren der STAT-Proteine. Unter diesen ist SOCS3 ein bekannter, direkter Gegenspieler zu dem Transkriptionsfaktor STAT3. STAT3 ist in verschiedenen Tumoren, unter anderem im Nierenzellkarzinom, vermehrt exprimiert und besitzt eine pro-onkogene Funktion (Horiguchi, Oya et al. 2002). STAT-Proteine spielen jedoch auch eine zentrale Rolle in der Steuerung von Immunzellen (Yu, Pardoll et al. 2009). STAT3 kann sowohl eine anti-onkogene Immunantwort auslösen, als auch durch kontinuierliche Aktivierung Signalwege induzieren, die zu Tumorentstehung und Tumorwachstum führen (Yu, Pardoll et al. 2009). Verschiedene Regulationsmechanismen auf Zellebene sind aktiv, um den STAT-Signalweg zu kontrollieren und gegebenenfalls zu blockieren.

Neben dieser Funktion sind SOCS-Proteine zudem physiologische Regulatoren des angeborenen und erworbenen Immunsystems. Es ist unter anderem belegt, dass sie bei Autoimmunerkrankungen wesentliche Funktionen besitzen (Yoshimura, Naka et al. 2007).

Es sind bereits Arbeiten zu der SOCS3-Expression in verschiedenen Tumoren gegenüber dem benachbarten tumorfreien Gewebe publiziert. Diesbezüglich stellte eine Untersuchung anhand des humanen nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms (NSCLC) *in vivo* und *in vitro* dar, dass SOCS3 in der Lage ist, das Tumorzellwachstum zu hemmen. In insgesamt 8 Proben aus humanem NSCLC konnte eine erniedrigte SOCS3-Genexpression gegenüber dem benachbarten gesunden Lungengewebe nachgewiesen werden (He, You et al. 2003). Auch in Magenkarzinomgewebe von 80 Patienten konnte eine erniedrigte SOCS3-Genexpression gegenüber dem benachbarten gesunden Magengewebe gemessen werden (Li, Xu et al. 2015). Eine weitere Arbeit an Gewebe von 20 Hepatitis C positiven Patienten mit hepatozellulärem Karzinom unterstützte die Hypothese, dass SOCS3 in Tumorgewebe vermindert ist, und daher vermutlich anti-onkogen wirksam ist (Ogata, Kobayashi et al. 2006). Die SOCS3-Genexpression zeigte sich im Karzinomgewebe gegenüber dem benachbarten tumorfreien Lebergewebe vermindert (Ogata, Kobayashi et al. 2006). In unseren Versuchen zeigten sich ähnliche Ergebnisse. In humanem klarzelligen Nierenzellkarzinom konnten wir nachweisen, dass SOCS3 im Tumorgewebe gegenüber dem zugehörigen nicht-tumorös befallenen

Nierengewebe auf Genebene erniedrigt ist. Dieses Ergebnis fügt sich zu den Erkenntnissen aus den anderen Tumorentitäten. Es ist theoretisch denkbar, dass durch das Fehlen von SOCS3 eine ungehemmte Phosphorylierung von STAT3 stattfindet, sodass der JAK-STAT-Signalweg kontinuierlich aktiviert wäre und es zur Zellproliferation kommt.

Weiterhin wurde SOCS3 als negativer Regulator des IL-6-Signalweges in Hepatozyten und Makrophagen beschrieben (Sutherland, Vaillant et al. 2006). IL-6 nimmt nachweislich sowohl an entzündlichen als auch an tumorösen Prozessen teil, zum Beispiel in Geweben des kolorektalen Karzinoms oder des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms (Guo, Xu et al. 2012). Im Hinblick darauf konnten wir in unseren Analysen eine erhöhte Genexpression von IL-6 im Nierenzellkarzinomgewebe gegenüber gesundem Nierengewebe nachweisen. Um den Zusammenhang zwischen SOCS3 und IL-6 zu ermitteln, untersuchten wir die SOCS3-Genexpression im Tumorgewebe, welche vermindert war. Unser Ergebnis passt zu der Theorie, dass SOCS3 IL-6 hemmt, bei niedrigem SOCS3 ist IL-6 vermehrt exprimiert, wie es in unserem Tumorgewebe veranschaulicht ist. Dieser Zusammenhang verleiht SOCS3 eine anti-onkogene Funktion. Leider sind in den oben genannten Publikationen keine Angaben zum Anteil von pSTAT3 in den jeweiligen Geweben gemacht, um die Hypothese, dass SOCS3 über eine Hemmung von pSTAT3 agiert, belegen zu können.

Interessanterweise konnten wir das Ergebnis, dass SOCS3 im Tumorgewebe vermehrt exprimiert ist, durch die Untersuchung von SOCS3 auf Proteinebene mittels Westernblot nicht bestätigen. Auf Proteinebene stellte sich eine erhöhte SOCS3-Expression in dem Nierenzellkarzinomgewebe gegenüber dem Normalgewebe dar. Bei 9 % der Patientenproben konnte das SOCS3-Protein in der Westernblot-Analyse jedoch nicht dargestellt werden.

Eine Erklärung für dieses konträre Ergebnis könnte sein, dass unmittelbar nach der Translation des SOCS3-Proteins wiederum Signalwege aktiviert werden, welche zu einem Abbau oder zu einer geringeren Produktion der SOCS3-mRNA führen. Das könnte erklären, warum das SOCS3-Protein nun weiterhin detektierbar ist ohne dass eine erhöhte Expression der zugehörigen mRNA vorliegt. Diese Annahme wird durch eine Arbeit, die sich *in vitro* mit der SOCS3-mRNA-Expression sowie der Proteinmenge im zeitlichen Verlauf beschäftigt hat, unterstützt (Hoegl, Bachmann et al. 2011). Durch Realtime-TaqMan-PCR wurde die SOCS3-mRNA-Expression in

Lungenepithelzellen nach 30 und 60 Minuten sowie nach 2, 4, 8 und 24 Stunden ermittelt. Es ließ sich eine starke Induktion der SOCS3-mRNA nach 30 und 60 Minuten verzeichnen, zu den späteren Zeitpunkten konnte keine gesteigerte mRNA-Expression mehr detektiert werden. Es kam zu einem Absinken bis nahezu auf den Ausgangswert (Hoegl, Bachmann et al. 2011). Es scheint demnach ein enges Zeitfenster für eine erhöhte SOCS3-mRNA-Expression zu geben. Interessant ist außerdem, wie sich die SOCS3-Proteinmenge zu den Zeiten 30 und 60 Minuten, sowie nach 2, 4, 8 und 24 Stunden, verhielt. Bei der Menge des SOCS3-Proteins war zunächst ebenso ein Anstieg zu verzeichnen, eine erhöhte SOCS3-Protein-Expression war jedoch auch noch nach 24 Stunden nachweisbar (Hoegl, Bachmann et al. 2011). In diesem Versuch würde man somit nach 24 Stunden ein vermehrtes SOCS3-Protein nachweisen können, jedoch keine erhöhte SOCS3-mRNA-Expression. Diese Untersuchungen an Lungenepithelzellen könnten einen Erklärungsansatz dafür liefern, warum ebenfalls im Nierenzellkarzinomgewebe die SOCS3-mRNA vermindert ist bei jedoch deutlich erhöhtem SOCS3-Protein.

Eine weitere Hypothese zur Erklärung des differenten Ergebnisses bezüglich der Gen- und Proteinexpression von SOCS3 liefert eine Studie an Gewebe des kleinzelligen Bronchialkarzinoms (He, You et al. 2003). In dieser wurde gezeigt, dass die SOCS3-mRNA in Tumorgewebe niedriger exprimiert war als in benachbartem gesunden Lungengewebe. In der SOCS3-DNA des Tumorgewebes wurde eine Hypermethylierung der CpG-Inseln des SOCS3-Promotors gefunden, was zu einer Stilllegung des Gens führte. Die Transkription von der DNA zur mRNA wurde somit unterbrochen. Die Methylierung der SOCS3-DNA war jedoch reversibel, *in vitro* wurde eine Demethylierung durchgeführt, Transkription und Translation von SOCS3 fanden danach erneut statt. Das nun höher exprimierte SOCS3-Protein führte schließlich zu einer erniedrigten Konzentration von pSTAT3 (He, You et al. 2003). Eine Inhibierung der Phosphorylierung von STAT3 beziehungsweise ein schneller Abbau von aktiviertem pSTAT3 durch SOCS3 könnte zu diesem Ergebnis geführt haben. Diese Untersuchungen zeigen eine Möglichkeit der Genregulation auf, die eine erniedrigte Proteinexpression trotz erhöhter mRNA-Expression erklären könnte, wie es in unserem gesunden Nierengewebe der Fall war. Neben der Methylierung der DNA sind auch Modifikationen auf Ebene der RNA bekannt, die zur Inhibierung oder Aktivierung der nachfolgenden Translation führen. Dazu zählen zum Beispiel chemische Veränderungen der in der RNA enthaltenen Basen wie 5-Methylcytosin oder des in 2016 publizierten

N<sup>1</sup>-Methyladenosin (Dominissini, Nachtergaele et al. 2016). Ergänzend müsste die mRNA auf solche Modifikationen genauer untersucht werden.

Wie lässt sich nun die verminderte SOCS3-Genexpression im Nierenzellkarzinomgewebe in Zusammenhang mit pSTAT3 bringen? Aus der Literatur geht hervor, dass pSTAT3 im Nierenzellkarzinomgewebe vermehrt exprimiert ist (Horiguchi, Oya et al. 2002). Da SOCS3 ein Inhibitor von pSTAT3 ist und SOCS3 im Tumorgewebe unserer untersuchten Patienten vermindert ist, wäre eine erhöhte Expression von pSTAT3 im Tumorgewebe zu erwarten. In unserer Arbeit führten wir daher ebenfalls Westernblot-Analysen zur Detektion von pSTAT3 und tSTAT3, jeweils im Tumor- und Normalgewebe, durch. Das Ergebnis war allerdings nicht eindeutig. In einigen Tumorproben konnte eine relative Erhöhung von pSTAT3 zur jeweiligen Menge von tSTAT3 nachgewiesen werden, in einigen anderen Proben schien pSTAT3 im Normalgewebe höher exprimiert zu sein. Ergebnisse aus vorherigen Studien, dass pSTAT3 auf Proteinebene im Nierenzellkarzinomgewebe erhöht ist, können wir aus unseren Untersuchungen weder bestätigen noch dementieren.

Gleichwohl scheinen STAT3 und SOCS3 aber nicht immer gegenläufig exprimiert zu sein, es scheint auch parallele Expressionen zu geben. Der Arbeit von Hoegl et al. ist zu entnehmen, dass die Expression von SOCS3 eine Voraussetzung für die pro-onkogenen Effekte von STAT3 ist (Hoegl, Bachmann et al. 2011). Sie konnten demonstrieren, dass nach Hemmung der STAT3-Aktivität durch STAT3-siRNA in den Lungenepithelzellen auch die Stimulation mit IL-22 keine SOCS3-mRNA-Expression induzierte. STAT3 und SOCS3 scheinen folglich voneinander abhängig zu sein.

Für einen anti-apoptotischen Effekt von SOCS3 spricht eine *in vitro* Untersuchung an proximalen Tubulusepithelzellen, die zeigte, dass SOCS3 die Phosphorylierung von STAT3 in diesen Zellen hemmt (Neuwirt, Eder et al. 2013). Durch die Deaktivierung von SOCS3 kam es zu einer gesteigerten Phosphorylierung von STAT3. Des Weiteren zeigte sich, dass SOCS3 ein STAT-unabhängiger Inhibitor der Proliferation in Zellen des proximalen Tubulus ist (Neuwirt, Eder et al. 2013). Das ist insofern interessant, da die Tumorzellen des klarzelligen Nierenzellkarzinoms aus Zellen des proximalen Tubulus hervorgehen (Thoenes, Storkel et al. 1986).

Kürzlich wurde SOCS3 mittels Immunohistochemie in verschiedenen histologischen Nierenzellkarzinomen untersucht, wobei gezeigt wurde, dass in 67,5 % der Proben sowohl SOCS3 als auch pSTAT3 detektiert werden konnten (davon 94 % klarzelliges

Nierenzellkarzinom) (Stofas, Levidou et al. 2014). Die Annahme, dass pSTAT3 mit Anwesenheit von SOCS3 pro-onkogen agiert, wird damit bestärkt. Zudem wurde ein Zusammenhang zwischen der immunohistochemischen SOCS3-Expression und dem Auftreten und Progress von Metastasen gefunden. In unserer Arbeit sind die Unterschiede der SOCS3-mRNA-Expression, also Erniedrigung in Tumorgewebe und Erhöhung in Normalgewebe, über die verschiedenen pathohistologischen Tumorstadien konstant. Im Hinblick auf die Fern- oder Lymphknotenmetastasierung konnte keine Assoziation zwischen erhöhter SOCS3-mRNA-Expression und fortgeschrittener Tumorerkrankung festgestellt werden. In einer weiteren Untersuchung wurde SOCS3 immunohistochemisch in Tumorgeweben von 186 Patienten mit Magenkarzinom nach einer kurativen Gastrektomie untersucht. In Bezug auf die prognostische Wertigkeit von SOCS3 ließ sich ein schlechteres Langzeitüberleben bei hohen SOCS3-Expressionen gegenüber niedrigeren Expressionen ermitteln (Li, Xu et al. 2015). Dies klingt widersprüchlich zu der Hypothese, dass SOCS3 eine anti-onkogene Funktion hat, da *in vivo* hohe SOCS3-Expressionen mit einem kürzeren Überleben assoziiert sind.

Um SOCS3 auch histomorphologisch darzustellen, führten wir immunohistochemische Untersuchungen der humanen Gewebeproben durch. SOCS3 konnte sowohl im Tumorgewebe als auch im Normalgewebe immunohistochemisch dargestellt werden. Die Negativkontrollen des Normalgewebes und des Tumorgewebes zeigten jeweils keine bis kaum angefärbte Bereiche. Die immunohistochemische Untersuchung diente zur Bestätigung der Ergebnisse der SOCS3-Proteinexpression mittels Westernblot-Analyse. Die Morphologie der zu vergleichenden Gewebe stellte sich jedoch komplett verschieden dar, sodass eine Beurteilung, in welchem Gewebe eine höhere SOCS3-Expression vorlag, nicht möglich war.

Allgemein zu beachten und von Relevanz in der Interpretation der Ergebnisse ist auch die Probengewinnung für die anschließend durchgeführten Untersuchungen. Im Gegensatz zu einem in Mäusen induzierten Nierentumor, wo das gesamte Tumorgewebe *in toto* entnommen und untersucht werden kann, ist bei der Gewinnung von Proben aus humanem Nierenzellkarzinomgewebe nur ein Bruchteil des makroskopischen Tumors für die Untersuchungen verwendet worden. Tumore sind sehr inhomogen. Während sich in den randständigen Anteilen eine vermehrte Angiogenese und vitales Tumorgewebe befindet, ist im Zentrum des Tumors mitunter mit weniger onkogener Aktivität zu rechnen. Zudem kann sich die Dauer von der chirurgischen

Entnahme bis zum Einfrieren des Gewebes unterscheiden, unter anderem durch den Transport. Ist diese länger, könnten durch Ischämie und Hypoxie zelluläre Prozesse induziert werden, welche maßgeblich den JAK-STAT-Signalweg, dessen einzelne Komponenten wir untersuchten, beeinflussen.

#### 4.2 Die Expression von IL-6 und CA-IX im klarzelligen Nierenzellkarzinom

Zytokine kontrollieren das Wachstum und die Differenzierung verschiedenster Zellen wie Immunzellen oder Tumorzellen. IL-6 ist ubiquitär an der Entstehung und an dem Wachstum verschiedener humaner Tumore beteiligt (Hong, Angelo et al. 2007). Über STAT3 aktiviert es verschiedene Zielgene, unter anderem VEGF, ein bekanntes Mitogen im klarzelligen Nierenzellkarzinom. Die pro-onkogene Funktion von IL-6 ist gut erforscht. Eine Überexpression von IL-6 führt zu einem Tumorprogress, zur Inhibierung der Apoptose von Tumorzellen, zur gesteigerten Angiogenese und zur Medikamenten-Resistenz (Guo, Xu et al. 2012). Bekannt ist, dass ein erhöhter Serum-IL-6-Spiegel mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium assoziiert ist, u.a. bei dem Multiplen Myelom, dem kleinzelligen Bronchialkarzinom, dem kolorektalen Karzinom, dem Prostata-Karzinom, dem Ovarial- und Mamma-Karzinom sowie dem Nierenzellkarzinom (Guo, Xu et al. 2012). Bei dem Multiplen Myelom ist seit einigen Jahren bereits der IL-6-Antagonist Siltuximab als möglicher Therapieansatz in Erprobung und findet bereits Anwendung in klinischen Phase I-Studien (Lin and Karin 2007, Shah, Feng et al. 2016). Siltuximab fand ebenfalls bereits Anwendung beim metastasierten Nierenzellkarzinom im Rahmen klinischer Phase I/II-Studien (Rossi, Negrier et al. 2010). Auch im Hinblick auf das Mamma-Karzinom existieren präklinische Studien mit Siltuximab und humanem Zellmaterial, die Erfolg versprechend sind (Abou-Shousha, Moaz et al. 2016, Casneuf, Axel et al. 2016).

Es ist zudem bekannt, dass IL-6 in der Genese paraneoplastischer Syndrome beim Nierenzellkarzinom eine Rolle spielt. Dazu gehören unter anderem Fieber, Leukozytose, Anämie, Gewichtsverlust und erhöhte Akute-Phase-Proteine im Serum (Blay, Rossi et al. 1997). Weiterhin wird vermutet, dass IL-6 Auslöser des paraneoplastischen Stauffer-Syndroms ist, das durch eine Leberwerterhöhung, die histologisch dem Bild einer Hepatitis entspricht, gekennzeichnet ist (Palapattu, Kristo et al. 2002). IL-6 ist außerdem ein bekannter Ligand zur Aktivierung des STAT3-Signalweges, mit pro-onkogener Funktion im Nierenzellkarzinom (Kaminska, Czarnecka et al. 2015). Auf



zellulärer Ebene ist IL-6 unter anderem ein autokriner Wachstumsfaktor, der von Nierenzellkarzinomzellen synthetisiert wird und in unmittelbarer Nachbarschaft die Zellproliferation stimuliert (Miki, Iwano et al. 1989). Das Zytokin wirkt über eine Aktivierung des membranständigen IL-6-Rezeptors, der aus 2 Untereinheiten besteht, dem 80-kD-Protein (gp80) und der 130-kD-transmembranen Komponente (gp130), die auch als Ko-Rezeptor beschrieben wird. Des Weiteren beschreibt eine Arbeit, dass als Antwort auf IL-6 neben der bekannten Phosphorylierung von STAT3 am Tyrosinrest (Tyr705) auch die Phosphorylierung an einem Serinrest (Ser727) für eine gesteigerte STAT3-Aktivität notwendig ist (Horiguchi, Oya et al. 2002).

Da SOCS3 als Gegenspieler von STAT3 agiert und STAT3 wiederum ein Teil des pro-onkogenen IL-6-Signalweges ist, untersuchten wir die Expression von IL-6 im humanen klarzelligen Nierenzellkarzinom gegenüber dem gesunden Nachbargewebe mittels Realtime-TaqMan-PCR. Wir konnten zeigen, dass die IL-6-mRNA-Expression im Tumorgewebe gegenüber dem Normalgewebe signifikant erhöht war. IL-6 ist neben der Funktion in Tumorgewebe auch allgemein an Entzündungsreaktionen beteiligt. In einer Studie wurde bereits die Rolle von IL-6 im Hinblick auf den Progress des Nierenzellkarzinoms untersucht (Cardillo and Ippoliti 2007). Die Autoren konnten immunohistochemisch bei 95 Patienten mit einem Nierenzellkarzinom eine erhöhte IL-6-Expression gegenüber dem benachbarten gesunden Gewebe nachweisen. Die Differenz war nicht signifikant, jedoch schien IL-6 mit einer Tumorprogression assoziiert zu sein (Cardillo and Ippoliti 2007). Eine weitere Untersuchung beschrieb, dass IL-6 und der lösliche IL-6-Rezeptor mit dem JAK-STAT-Signalweg eine Schlüsselrolle in der Metastasierung des klarzelligen Nierenzellkarzinoms einnehmen (Kaminska, Czarnecka et al. 2015). Aus diesem Grund fanden viele Untersuchungen dazu statt, ob IL-6 ein geeigneter Prognosemarker sein könnte. In einer klinischen Studie an 89 Patienten mit lokalisiertem klarzelligen Nierenzellkarzinom wurde der IL-6-Spiegel zu verschiedenen Zeitpunkten im peripheren Blut in Zusammenhang mit dem Langzeitüberleben untersucht (Hrab, Olek-Hrab et al. 2013). Das Patientenkollektiv wies zum Zeitpunkt der durchgeführten Messungen weder Lymphknotenmetastasen noch Fernmetastasen auf und wurde einseitig nephrektomiert. Es stellte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen präoperativ erhöhten IL-6-Spiegeln im Serum und einem schlechten Langzeitüberleben dar. IL-6 korrelierte mit einer schlechten Prognose (Hrab, Olek-Hrab et al. 2013). Unser Ergebnis, dass IL-6 im

Nierenzellkarzinom erhöht ist gegenüber dem gesunden Gewebe lässt sich mit der älteren und aktuellen Literatur in Einklang bringen.

Ein weiteres, in Nierenzellkarzinomgewebe gut untersuchtes, Protein ist die Carboanhydrase-IX (CA-IX). Sie gehört zur Familie der Carboanhydrasen, einer Gruppe von insgesamt 13 Enzymen. Die CA-IX ist ein zytosolisches membranständiges Enzym und reguliert den pH-Wert, sie ist aber auch an der Zellproliferation und Tumorgenese beteiligt (Hilvo, Baranauskiene et al. 2008). Herrscht im Gewebe Hypoxie, akkumuliert der Transkriptionsfaktor HIF-1 $\alpha$ . HIF steht für "hypoxia-inducible-factor", 1 $\alpha$  ist eine von drei Isoformen. Die Synthese verschiedener Proteine wird dadurch induziert, unter anderem Erythropoetin, VEGF und CA-IX (Hilvo, Baranauskiene et al. 2008; Ljungberg, Bensalah et al. 2015). Wird die CA-IX exprimiert, katalysiert sie Reaktionen, die zur Normalisierung des pH-Wertes in saurem Gewebe führen.

Die CA-IX ist in verschiedenen Tumoren aktiv und insbesondere im klarzelligen Nierenzellkarzinom hoch exprimiert. Eine Studie konnte die CA-IX immunohistochemisch in 94 % von insgesamt 321 Proben aus humanem klarzelligen Nierenzellkarzinom detektieren (Bui, Seligson et al. 2003). In gesundem Nierenparenchym scheint die CA-IX hingegen nicht nachweisbar zu sein (Bui, Seligson et al. 2003; Sandlund, Oosterwijk et al. 2007). Aus diesem Grund sind zahlreiche Veröffentlichungen zu finden, die sich der CA-IX als Biomarker im metastasierten klarzelligen Nierenzellkarzinom widmen. Ziel dabei war es, eine Prognose zum Langzeitüberleben oder dem Therapieansprechen ableiten zu können. In anderen humanen Tumorgeweben, wie dem Zervixkarzinom, Bronchialkarzinom, Ösophaguskarzinom oder Mammakarzinom, wurde bereits eine Assoziation zwischen einer erhöhten CA-IX-Expression und einem schlechten Langzeitüberleben beschrieben (Sandlund, Oosterwijk et al. 2007). Bezüglich des Nierenzellkarzinoms stellten einige Arbeiten einen Zusammenhang zwischen einer erniedrigten CA-IX-Expression im Nierenzellkarzinomgewebe und einem schlechten Langzeitüberleben fest (Leibovich, Sheinin et al. 2007, Patard, Fergelot et al. 2008). Pathophysiologisch wurde argumentiert, dass bei niedriger CA-IX-Expression ein saurer pH-Wert sowie Hypoxie im Gewebe bestehen bleiben. Tumorzellen, die in solch einem Milieu überleben, müssten aggressiver sein, um die Gewebeumstände überwinden zu können. Im Gegensatz dazu präsentierte eine andere Arbeit das Ergebnis, dass die Expression der

CA-IX nicht mit dem Gesamtüberleben korrelierte. Die Autoren untersuchten die Korrelation zwischen der CA-IX-Expression und dem Langzeitüberleben bei 95 Patienten mit nicht metastasiertem klarzelligen Nierenzellkarzinom (Zerati, Leite et al. 2013). Weiterhin konnten sie keinen Zusammenhang zu dem Grad nach Fuhrman oder dem TNM-Stadium finden (Zerati, Leite et al. 2013). In einem Mausmodell wurde ein CA-IX-Antikörper angewendet und die Auswirkungen auf Zellebene untersucht. Es kam zu einer Hemmung der Zellmigration und zur Induktion einer Immunantwort gegen klarzellige Nierenzellkarzinomzellen (Chang, Moniz et al. 2015). Die Rolle der CA-IX bezüglich der Prognose in verschiedenen Tumoren wird somit kontrovers diskutiert.

Um das Gewebe zu validieren untersuchten wir die Expression der CA-IX mittels Realtime-TaqMan-PCR in den Patientenproben. Es zeigte sich eine signifikant erhöhte Expression der CA-IX-mRNA im Tumorgewebe gegenüber dem gesunden Gewebe. In dem benachbarten Normalgewebe konnte die CA-IX-mRNA kaum detektiert werden. Die bisherigen Untersuchungen, dass die CA-IX im klarzelligen Nierenzellkarzinom exprimiert ist, konnten wir bestätigen und somit unsere Gewebeproben als für diesen Tumor repräsentativ validieren. In der Literatur gibt es bisher keine Arbeiten, die den Zusammenhang von CA-IX zu SOCS3 und STAT3 im Nierenzellkarzinom untersuchten. Allerdings wurde zu diesem Thema eine Studie bezüglich des Ösophaguskarzinoms publiziert. In humanen Proben aus Ösophaguskarzinomgewebe wurde eine positive Korrelation zwischen pSTAT3 und der CA-IX-Expression festgestellt. Diese Ko-Expression war mit einem Tumorprogress und einer schlechten Prognose assoziiert. Auch wurde erwähnt, dass pSTAT3 die CA-IX-Expression reguliert (Schoppmann, Jesch et al. 2012). Es ist denkbar, dass pSTAT3, das bekanntermaßen im Nierenzellkarzinom konstitutiv aktiv ist, die CA-IX induziert. Inwiefern die CA-IX Auswirkungen auf die SOCS3-Expression hat, ist unklar. Zu SOCS3 und HIF-1 $\alpha$ , einem bekannten Induktor der CA-IX, wurde eine *in vivo* Studie mit Zellen des kleinzelligen Bronchialkarzinoms durchgeführt. Es zeigte sich, dass SOCS3 in diesen Zellen die Expression von HIF-1 $\alpha$  hemmt, was zur Inhibierung der Zellproliferation führte (Wan, Che et al. 2015).

#### 4.3 IFN- $\gamma$ induziert die SOCS3-Expression in einer Nierenzellkarzinom-Zelllinie

Da wir feststellen konnten, dass SOCS3 in Nierenzellkarzinomgewebe reguliert ist, untersuchten wir nun *in vitro*, über welche Zytokine die SOCS3-Expression

hochreguliert werden könnte. Wir verwendeten immortalisierte Caki-1-Zellen, die ursprünglich aus einem humanen klarzelligen Nierenzellkarzinom isoliert wurden. Die Stimulation erfolgte mit IL-6 und IFN- $\gamma$  für eine Dauer von 30 Minuten mit jeweils steigenden Interleukin-Konzentrationen. Nach Stimulation mit IL-6 konnte keine Änderung der SOCS3-Expression gemessen werden. Grund dafür ist der fehlende Ko-Rezeptor gp130 auf der Zelloberfläche der Caki-1-Zellen, der zur Aktivierung des JAK-STAT-Signalweges durch IL-6 notwendig ist (Horiguchi, Oya et al. 2002). Es ergibt sich somit die Vermutung, dass IL-6 ohne gp130 nicht zur STAT3-Aktivierung führen kann. Dies zeigt eine Möglichkeit auf, den durch IL-6 aktivierten JAK-STAT-Signalweg zu hemmen, zum Beispiel indem man den Ko-Rezeptor gp130 mit einem Antikörper blockiert. Bezüglich der SOCS3-Induktion durch IL-6 untersuchte eine Arbeitsgruppe Lebergewebe und stellte fest, dass IL-6 dort ebenfalls ein Induktor der SOCS3-Expression ist (Ogata, Kobayashi et al. 2006). Im Hinblick auf diese Ergebnisse ist zudem relevant, dass Caki-1-Zellen bekanntermaßen verschiedene Zytokine synthetisieren und diese autokrin sowie parakrin sezernieren können. IL-6 wurde als ein solches identifiziert, wobei sich jedoch nur geringe Mengen davon fanden (Horiguchi, Oya et al. 2002).

Interessanterweise konnte nach der Stimulation der Caki-1-Zellen mit IFN- $\gamma$  eine erhöhte SOCS3-mRNA-Expression gemessen werden, unabhängig von der Konzentration des Interferons. IFN- $\gamma$  ist ein Mediator bei der Immunantwort des adaptiven, also humoralen, Immunsystems. Der IFN- $\gamma$ -Rezeptor ist in nahezu allen humanen Zelltypen vorhanden. Eine Arbeit an Sarkomen in Mäusen hat gezeigt, dass die Tumorentstehung nach Hemmung von IFN- $\gamma$  durch entsprechende Antikörper zu einem deutlichen Tumorprogress führte (Koebel, Vermi et al. 2007). Weiterhin ist bekannt, dass eine Subgruppe der T-Helferzellen (Th1) durch IFN- $\gamma$  zur Hemmung des Tumorwachstums führen. Ein Versuch an Wildtyp-Mäusen gegenüber Mäusen, denen der IFN- $\gamma$ -Rezeptor fehlte, hat gezeigt, dass in den Rezeptor-defizienten Mäusen schneller und öfter Tumore gewachsen sind. Die anti-onkogene Funktion von IFN- $\gamma$  ist somit bereits gut erforscht (Kaplan, Shankaran et al. 1998). IFN- $\gamma$  aktiviert eine JAK-STAT-Signalkaskade, woran STAT1 beteiligt ist, und führt zur Genregulation. STAT1 ist wiederum ein Inhibitor von STAT3, wodurch IFN- $\gamma$  ebenfalls tumorsuppressiv zu wirken scheint (Yu and Jove 2004). In einer weiteren Studie mit IFN- $\gamma$ -knock-out-Mäusen wurde eine erhöhte Expression von pSTAT3 gefunden (Wang, Yi et al. 2009).

pSTAT3 ist bekanntermaßen auch in Nierenzellkarzinomgewebe erhöht exprimiert. In unserem Zellmodell wurde SOCS3, ein Inhibitor von STAT3, durch IFN- $\gamma$  induziert. Die Hypothese, dass IFN- $\gamma$  durch Induktion von SOCS3 in Nierenzellkarzinomgewebe agiert, lässt sich damit unterstützen. Fehlt IFN- $\gamma$ , kommt es vermutlich zu einer verminderten SOCS3-Expression und damit zu einer ungehemmten STAT3-Aktivierung, was Tumorentstehung und Tumorwachstum verursachen könnte. Widersprüchlich dazu, gibt eine Untersuchung bekannt, dass IFN- $\gamma$  zur Phosphorylierung von STAT3 führt (Murray 2007). Somit wäre der JAK-STAT-Signalweg aktiv und IFN- $\gamma$  käme eine pro-onkogene Funktion zu.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass SOCS3 in humanem Nierenzellkarzinomgewebe reguliert ist. Es ist auf Genebene vermindert exprimiert, auf Proteinebene jedoch höher exprimiert als im gesunden Nierengewebe. In der Literatur gibt es Hinweise für anti-onkogene Effekte von SOCS3 in verschiedenen Tumoren, da es als Gegenspieler zu STAT3 dessen Aktivierung hemmt. Dahingegen beschrieben andere Untersuchungen, dass STAT3 und SOCS3 im Nierenzellkarzinom synchron exprimiert sind. *In vitro* konnte die SOCS3-Expression durch IFN- $\gamma$  deutlich induziert werden. Dieses Interferon ist an Prozessen des Immunsystems und bekanntermaßen an der anti-tumoralen Immunantwort wesentlich beteiligt. Zur weiteren Klärung der genauen Funktion von SOCS3 im klarzelligen Nierenzellkarzinomgewebe wären weiterführende *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen nötig, die insbesondere SOCS3 und dessen lokale und systemische Induktoren als auch die Zielgene untersuchen. Daraus hervorgehende detaillierte Kenntnisse der Signalwege zwischen Immunzellen und Karzinomzellen könnten neue Angriffspunkte für die Tumorthherapie liefern.

## 5. Zusammenfassung

Der suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) ist ein negativer Gegenspieler des signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). STAT3 selbst ist ein Transkriptionsfaktor und reguliert Zielgene, die bei der Zellproliferation, Differenzierung und Tumorentstehung beteiligt sind. STAT3 liegt im humanen Nierenzellkarzinom phosphoryliert und damit konstitutiv aktiv vor. Wir untersuchten die Expression von SOCS3 in Gewebeproben aus humanem klarzelligen Nierenzellkarzinom sowie dem benachbarten gesunden Nierengewebe von 35 Patienten. Des Weiteren stimulierten wir Caki-1-Zellen, eine kommerziell erhältliche Zelllinie, die aus einem klarzelligen Nierenzellkarzinom stammt, mit den Zytokinen IL-6 und IFN- $\gamma$  und untersuchten die SOCS3-Expression. SOCS3 wurde in den humanen Gewebeproben auf Genebene mittels Realtime-TaqMan-PCR sowie auf der Ebene des Proteins mittels Westernblot und Immunohistochemie dargestellt.

Wir beobachteten eine signifikant niedrigere SOCS3-Expression im Tumorgewebe gegenüber dem gesunden Nierengewebe. Dahingegen zeigte sich das SOCS3-Protein im Tumorgewebe höher exprimiert als im zugehörigen gesunden Nierengewebe. Die Stimulation der Caki-1-Zellen mit IL-6 zeigte keinen Anstieg der SOCS3-Expression. Nach Stimulation mit IFN- $\gamma$  konnte hingegen ein signifikanter Anstieg festgestellt werden.

Aus den Ergebnissen lässt sich entnehmen, dass SOCS3 im klarzelligen Nierenzellkarzinom reguliert ist und daher in der Tumorentstehung und der Tumorausbreitung involviert sein könnte. SOCS3 könnte ein neues Zielprotein in der onkologischen Therapie des klarzelligen Nierenzellkarzinoms sein, da es in der Lage ist, den aktivierten JAK-STAT-Signalweg zu beeinflussen.

Ob weitere lokale Faktoren in der Tumormikroumgebung an der SOCS3-Regulation beteiligt sind und welche genaue Funktion SOCS3 auf pSTAT3 im Nierenzellkarzinom hat, lässt sich nur durch weiterführende Untersuchungen beantworten.

## 6. Summary

The suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) is a negative regulator of the signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). STAT3 is a transcription factor and controls target genes, which are involved in cell proliferation, differentiation and tumorigenic process. STAT3 is existent in a phosphorylated form in human renal cell carcinoma and is thereby constitutively activated. We investigated the expression of SOCS3 in tissue samples of human clear cell renal cell carcinoma compared with adjacent healthy renal tissue of 35 patients. Furthermore, we stimulated Caki-1-cells, a commercially available cell line which originates from a clear cell renal cell carcinoma, with the cytokines IL-6 and IFN- $\gamma$  and measured the SOCS3-expression hereafter. The SOCS3-gene was represented by realtime-taqman-PCR in the human tissue samples, the SOCS3-protein was detected by westernblot and immunohistochemistry.

We observed a significant lower SOCS3-mRNA-expression in tumor tissue than in adjacent healthy renal tissue. Whereas the SOCS3-protein was higher expressed in tumor tissue than in adjacent healthy renal tissue. The stimulation of Caki-1-cells with IL-6 generated no increase of SOCS3-expression. However, after stimulation with IFN- $\gamma$ , a significant increase of SOCS3-expression was determined.

In conclusion, the results show that SOCS3 is regulated in human clear cell renal cell carcinoma and that it might be involved in tumorigenic process and tumor dissemination. SOCS3 could represent a new target protein in the oncologic therapy of clear cell renal cell carcinoma considering its ability to influence the activated JAK-STAT-pathway. However, further examinations are necessary to investigate whether additional local factors within the tumor microenvironment may be involved in the SOCS3-regulation and to reveal the detailed effect SOCS3 exerts on pSTAT3 in renal cell carcinoma.

## 7. Literaturverzeichnis

- 1 Abou-Shousha, S., M. Moaz, M. Sheta and M. A. Motawea (2016). "An Approach to Breast Cancer Immunotherapy: The Apoptotic Activity of Recombinant Anti-Interleukin-6 Monoclonal Antibodies in Intact Tumor Microenvironment of Breast Carcinoma." *Scand J Immunol*.
- 2 Alt, A. L., S. A. Boorjian, C. M. Lohse, B. A. Costello, B. C. Leibovich and M. L. Blute (2011). "Survival after complete surgical resection of multiple metastases from renal cell carcinoma." *Cancer* 117(13): 2873-2882.
- 3 Armah, H. B. and A. V. Parwani (2010). "Xp11.2 translocation renal cell carcinoma." *Arch Pathol Lab Med* 134(1): 124-129.
- 4 Beuselinck, B., Y. A. Vano, S. Oudard, P. Wolter, R. De Smet, L. Depoorter, C. Teghom, A. Karadimou, J. Zucman-Rossi, P. R. Debruyne, H. Van Poppel, S. Joniau, E. Lerut, M. Strijbos, H. Dumez, R. Paridaens, B. Van Calster and P. Schoffski (2013). "Prognostic impact of baseline serum C-reactive protein in patients with metastatic renal cell carcinoma (RCC) treated with sunitinib." *BJU international*.
- 5 Blay, J. Y., J. F. Rossi, J. Wijdenes, C. Menetrier-Caux, S. Schemann, S. Negrier, T. Philip and M. Favrot (1997). "Role of interleukin-6 in the paraneoplastic inflammatory syndrome associated with renal-cell carcinoma." *Int J Cancer* 72(3): 424-430.
- 6 Böcker, Denk et al. (Hrsg.): *Pathologie*. 5. Auflage. München: Urban & Fischer, 2012, S.717-718.
- 7 Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* 72: 248-254.
- 8 Bui, M. H., D. Seligson, K. R. Han, A. J. Pantuck, F. J. Dorey, Y. Huang, S. Horvath, B. C. Leibovich, S. Chopra, S. Y. Liao, E. Stanbridge, M. I. Lerman, A. Palotie, R. A. Figlin and A. S. Belldegrun (2003). "Carbonic anhydrase IX is an independent predictor of survival in advanced renal clear cell carcinoma: implications for prognosis and therapy." *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 9(2): 802-811.
- 9 Bustin, S. A. (2000). "Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays." *J Mol Endocrinol* 25(2): 169-193.
- 10 Bustin, S. A. and I. A. McKay (1999). "The product of the primary response gene BRF1 inhibits the interaction between 14-3-3 proteins and cRaf-1 in the yeast trihybrid system." *DNA Cell Biol* 18(8): 653-661.
- 11 Cardillo, M. R. and F. Ippoliti (2007). "Interleukin-6, interleukin-10 and heat shock protein-90 expression in renal epithelial neoplasias and surrounding normal-appearing renal parenchyma." *Int J Immunopathol Pharmacol* 20(1): 37-46.



- 12 Casneuf, T., A. E. Axel, P. King, J. D. Alvarez, J. L. Werbeck, T. Verhulst, K. Verstraeten, B. M. Hall and A. K. Sasser (2016). "Interleukin-6 is a potential therapeutic target in interleukin-6 dependent, estrogen receptor-alpha-positive breast cancer." *Breast Cancer (Dove Med Press)* 8: 13-27.
- 13 Castro, A., Jr., L. C. Jenkins, N. Salas, G. Lorber and R. J. Leveillee (2013). "Ablative therapies for small renal tumours." *Nat Rev Urol* 10(5): 284-291.
- 14 Chang, D. K., R. J. Moniz, Z. Xu, J. Sun, S. Signoretti, Q. Zhu and W. A. Marasco (2015). "Human anti-CAIX antibodies mediate immune cell inhibition of renal cell carcinoma in vitro and in a humanized mouse model in vivo." *Mol Cancer* 14: 119.
- 15 Chang, Q., E. Bournazou, P. Sansone, M. Berishaj, S. P. Gao, L. Daly, J. Wels, T. Theilen, S. Granitto, X. Zhang, J. Cotari, M. L. Alpaugh, E. de Stanchina, K. Manova, M. Li, M. Bonafe, C. Ceccarelli, M. Taffurelli, D. Santini, G. Altan-Bonnet, R. Kaplan, L. Norton, N. Nishimoto, D. Huszar, D. Lyden and J. Bromberg (2013). "The IL-6/JAK/Stat3 feed-forward loop drives tumorigenesis and metastasis." *Neoplasia* 15(7): 848-862.
- 16 Cheville, J. C., C. M. Lohse, H. Zincke, A. L. Weaver and M. L. Blute (2003). "Comparisons of outcome and prognostic features among histologic subtypes of renal cell carcinoma." *Am J Surg Pathol* 27(5): 612-624.
- 17 Choueiri, T. K., F. A. Schutz, N. D. Hevelone, P. L. Nguyen, S. R. Lipsitz, S. B. Williams, S. G. Silverman and J. C. Hu (2011). "Thermal ablation vs surgery for localized kidney cancer: a Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) database analysis." *Urology* 78(1): 93-98.
- 18 Clague, J., J. Lin, A. Cassidy, S. Matin, N. M. Tannir, P. Tamboli, C. G. Wood and X. Wu (2009). "Family history and risk of renal cell carcinoma: results from a case-control study and systematic meta-analysis." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18(3): 801-807.
- 19 Cobo-Dols, M., I. Ales-Diaz, E. Villar-Chamorro, S. Gil-Calle, J. Alcaide-Garcia, A. Montesa-Pino, V. Gutierrez-Calderon and M. Benavides-Orgaz (2006). "Solitary metastasis in a nasal fossa as the first manifestation of a renal carcinoma." *Clin Transl Oncol* 8(4): 298-300.
- 20 Dash, A., A. J. Vickers, L. R. Schachter, A. M. Bach, M. E. Snyder and P. Russo (2006). "Comparison of outcomes in elective partial vs radical nephrectomy for clear cell renal cell carcinoma of 4-7 cm." *BJU international* 97(5): 939-945.
- 21 Decker, T. and A. Meinke (1997). "Jaks, Stats and the immune system." *Immunobiology* 198(1-3): 99-111.
- 22 Dominissini, D., S. Nachtergaele, S. Moshitch-Moshkovitz, E. Peer, N. Kol, M. S. Ben-Haim, Q. Dai, A. Di Segni, M. Salmon-Divon, W. C. Clark, G. Zheng, T. Pan, O. Solomon, E. Eyal, V. Hershkovitz, D. Han, L. C. Dore, N. Amariglio, G. Rechavi and C. He (2016). "The dynamic N(1)-methyladenosine methylome in eukaryotic messenger RNA." *Nature* 530(7591): 441-446.

- 23 Dragoescu, E. A. and L. Liu (2013). "Indications for renal fine needle aspiration biopsy in the era of modern imaging modalities." *Cytojournal* 10: 15.
- 24 Ekelund, E., A. Saaf, M. Tengvall-Linder, E. Melen, J. Link, J. Barker, N. J. Reynolds, S. J. Meggitt, J. Kere, C. F. Wahlgren, G. Pershagen, M. Wickman, M. Nordenskjold, I. Kockum and M. Bradley (2006). "Elevated expression and genetic association links the SOCS3 gene to atopic dermatitis." *Am J Hum Genet* 78(6): 1060-1065.
- 25 Erdogan, F., A. Demirel and O. Polat (2004). "Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma." *Int J Clin Pract* 58(4): 333-336.
- 26 Evans, M. K., C. R. Yu, A. Lohani, R. M. Mahdi, X. Liu, A. R. Trzeciak and C. E. Egwuagu (2007). "Expression of SOCS1 and SOCS3 genes is differentially regulated in breast cancer cells in response to proinflammatory cytokine and growth factor signals." *Oncogene* 26(13): 1941-1948.
- 27 Flanigan, R. C., G. Mickisch, R. Sylvester, C. Tangen, H. Van Poppel and E. D. Crawford (2004). "Cytoreductive nephrectomy in patients with metastatic renal cancer: a combined analysis." *J Urol* 171(3): 1071-1076.
- 28 Frank, I., M. L. Blute, J. C. Cheville, C. M. Lohse, A. L. Weaver and H. Zincke (2002). "An outcome prediction model for patients with clear cell renal cell carcinoma treated with radical nephrectomy based on tumor stage, size, grade and necrosis: the SSIGN score." *J Urol* 168(6): 2395-2400.
- 29 Fuhrman, S. A., L. C. Lasky and C. Limas (1982). "Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma." *Am J Surg Pathol* 6(7): 655-663.
- 30 Fujimoto, M. and T. Naka (2003). "Regulation of cytokine signaling by SOCS family molecules." *Trends Immunol* 24(12): 659-666.
- 31 Ganini, C., A. Lasagna, E. Ferraris, P. Gatti, C. Paglino, I. Imarisio, P. Morbini, M. Benazzo and C. Porta (2012). "Lingual metastasis from renal cell carcinoma: a case report and literature review." *Rare Tumors* 4(3): e41.
- 32 Glube, N., A. Giessl, U. Wolfrum and P. Langguth (2007). "Caki-1 cells represent an in vitro model system for studying the human proximal tubule epithelium." *Nephron Exp Nephrol* 107(2): e47-56.
- 33 Gore, M. E., C. L. Griffin, B. Hancock, P. M. Patel, L. Pyle, M. Aitchison, N. James, R. T. Oliver, J. Mardiak, T. Hussain, R. Sylvester, M. K. Parmar, P. Royston and P. F. Mulders (2010). "Interferon alfa-2a versus combination therapy with interferon alfa-2a, interleukin-2, and fluorouracil in patients with untreated metastatic renal cell carcinoma (MRC RE04/EORTC GU 30012): an open-label randomised trial." *Lancet* 375(9715): 641-648.
- 34 Guo, C., G. Yang, K. Khun, X. Kong, D. Levy, P. Lee and J. Melamed (2009). "Activation of Stat3 in renal tumors." *Am J Transl Res* 1(3): 283-290.

- 35 Guo, Y., F. Xu, T. Lu, Z. Duan and Z. Zhang (2012). "Interleukin-6 signaling pathway in targeted therapy for cancer." *Cancer Treat Rev* 38(7): 904-910.
- 36 He, B., L. You, K. Uematsu, K. Zang, Z. Xu, A. Y. Lee, J. F. Costello, F. McCormick and D. M. Jablons (2003). "SOCS-3 is frequently silenced by hypermethylation and suppresses cell growth in human lung cancer." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(24): 14133-14138.
- 37 Heng, D. Y., W. Xie, M. M. Regan, M. A. Warren, A. R. Golshayan, C. Sahi, B. J. Eigel, J. D. Ruether, T. Cheng, S. North, P. Venner, J. J. Knox, K. N. Chi, C. Kollmannsberger, D. F. McDermott, W. K. Oh, M. B. Atkins, R. M. Bukowski, B. I. Rini and T. K. Choueiri (2009). "Prognostic factors for overall survival in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with vascular endothelial growth factor-targeted agents: results from a large, multicenter study." *J Clin Oncol* 27(34): 5794-5799.
- 38 Hilvo, M., L. Baranauskiene, A. M. Salzano, A. Scaloni, D. Matulis, A. Innocenti, A. Scozzafava, S. M. Monti, A. Di Fiore, G. De Simone, M. Lindfors, J. Janis, J. Valjakka, S. Pastorekova, J. Pastorek, M. S. Kulomaa, H. R. Nordlund, C. T. Supuran and S. Parkkila (2008). "Biochemical characterization of CA IX, one of the most active carbonic anhydrase isozymes." *The Journal of biological chemistry* 283(41): 27799-27809.
- 39 Hoegl, S., M. Bachmann, P. Scheiermann, I. Goren, C. Hofstetter, J. Pfeilschifter, B. Zwissler and H. Muhl (2011). "Protective properties of inhaled IL-22 in a model of ventilator-induced lung injury." *American journal of respiratory cell and molecular biology* 44(3): 369-376.
- 40 Holland, S. M., F. R. DeLeo, H. Z. Elloumi, A. P. Hsu, G. Uzel, N. Brodsky, A. F. Freeman, A. Demidowich, J. Davis, M. L. Turner, V. L. Anderson, D. N. Darnell, P. A. Welch, D. B. Kuhns, D. M. Frucht, H. L. Malech, J. I. Gallin, S. D. Kobayashi, A. R. Whitney, J. M. Voyich, J. M. Musser, C. Woellner, A. A. Schaffer, J. M. Puck and B. Grimbacher (2007). "STAT3 mutations in the hyper-IgE syndrome." *N Engl J Med* 357(16): 1608-1619.
- 41 Hong, D. S., L. S. Angelo and R. Kurzrock (2007). "Interleukin-6 and its receptor in cancer: implications for translational therapeutics." *Cancer* 110(9): 1911-1928.
- 42 Horiguchi, A., M. Oya, K. Marumo and M. Murai (2002). "STAT3, but not ERKs, mediates the IL-6-induced proliferation of renal cancer cells, ACHN and 769P." *Kidney Int* 61(3): 926-938.
- 43 Horiguchi, A., M. Oya, T. Shimada, A. Uchida, K. Marumo and M. Murai (2002). "Activation of signal transducer and activator of transcription 3 in renal cell carcinoma: a study of incidence and its association with pathological features and clinical outcome." *J Urol* 168(2): 762-765.
- 44 Horiuchi, Y., S. J. Bae and I. Katayama (2006). "Overexpression of the suppressor of cytokine signalling 3 (SOCS3) in severe atopic dermatitis." *Clin Exp Dermatol* 31(1): 100-104.

- 45 Houtzager, S., H. Wijkstra, J. J. de la Rosette and M. P. Laguna (2013). "Evaluation of renal masses with contrast-enhanced ultrasound." *Curr Urol Rep* 14(2): 116-123.
- 46 Hrab, M., K. Olek-Hrab, A. Antczak, Z. Kwias and T. Milecki (2013). "Interleukin-6 (IL-6) and C-reactive protein (CRP) concentration prior to total nephrectomy are prognostic factors in localized renal cell carcinoma (RCC)." *Rep Pract Oncol Radiother* 18(5): 304-309.
- 47 Huguenin, P. U., S. Kieser, C. Glanzmann, R. Capaul and U. M. Lutolf (1998). "Radiotherapy for metastatic carcinomas of the kidney or melanomas: an analysis using palliative end points." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 41(2): 401-405.
- 48 Hwang, E. C., H. S. Yu and D. D. Kwon (2013). "Small renal masses: surgery or surveillance." *Korean J Urol* 54(5): 283-288.
- 49 Inagaki-Ohara, K., T. Kondo, M. Ito and A. Yoshimura (2013). "SOCS, inflammation, and cancer." *JAKSTAT* 2(3): e24053.
- 50 Jeong, W., K. H. Rha, H. H. Kim, S. S. Byun, T. G. Kwon, I. Y. Seo, G. T. Sung, S. H. Jeon, Y. B. Jeong and S. H. Hong (2011). "Comparison of laparoscopic radical nephrectomy and open radical nephrectomy for pathologic stage T1 and T2 renal cell carcinoma with clear cell histologic features: a multi-institutional study." *Urology* 77(4): 819-824.
- 51 Kaminska, K., A. M. Czarnecka, B. Escudier, F. Lian and C. Szczylik (2015). "Interleukin-6 as an emerging regulator of renal cell cancer." *Urol Oncol* 33(11): 476-485.
- 52 Kaplan, D. H., V. Shankaran, A. S. Dighe, E. Stockert, M. Aguet, L. J. Old and R. D. Schreiber (1998). "Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(13): 7556-7561.
- 53 Kershaw, N. J., J. M. Murphy, N. P. Liao, L. N. Varghese, A. Laktyushin, E. L. Whitlock, I. S. Lucet, N. A. Nicola and J. J. Babon (2013). "SOCS3 binds specific receptor-JAK complexes to control cytokine signaling by direct kinase inhibition." *Nat Struct Mol Biol* 20(4): 469-476.
- 54 King, S. C., L. Pollack, J. Li, J. B. King and V. A. Master (2014). "Continued Rise in Incidence of Renal Cell Carcinoma, Especially in Young and High-Grade Disease-US 2001-2010." *J Urol*.
- 55 Klatte, T., B. Streubel, F. Wrba, M. Remzi, B. Krammer, M. de Martino, M. Waldert, M. Marberger, M. Susani and A. Haitel (2012). "Renal cell carcinoma associated with transcription factor E3 expression and Xp11.2 translocation: incidence, characteristics, and prognosis." *Am J Clin Pathol* 137(5): 761-768.
- 56 Kobayashi, A., M. Takahashi, H. Imai, S. Akiyama, S. Sugiyama, K. Komine, K. Saijo, S. Takahashi, H. Shiota, N. Sato, F. Fujishima, T. Shuin, H. Shimodaira and C. Ishioka (2016). "Attainment of a Long-term Favorable Outcome by Sunitinib

Treatment for Pancreatic Neuroendocrine Tumor and Renal Cell Carcinoma Associated with von Hippel-Lindau Disease." *Intern Med* 55(6): 629-634.

- 57 Koebel, C. M., W. Vermi, J. B. Swann, N. Zerafa, S. J. Rodig, L. J. Old, M. J. Smyth and R. D. Schreiber (2007). "Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state." *Nature* 450(7171): 903-907.
- 58 Kunkle, D. A. and R. G. Uzzo (2008). "Cryoablation or radiofrequency ablation of the small renal mass : a meta-analysis." *Cancer* 113(10): 2671-2680.
- 59 Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(5259): 680-685.
- 60 Lee, C. T., J. Katz, P. A. Fearn and P. Russo (2002). "Mode of presentation of renal cell carcinoma provides prognostic information." *Urol Oncol* 7(4): 135-140.
- 61 Lee, H., J. Deng, M. Kujawski, C. Yang, Y. Liu, A. Herrmann, M. Kortylewski, D. Horne, G. Somlo, S. Forman, R. Jove and H. Yu (2010). "STAT3-induced S1PR1 expression is crucial for persistent STAT3 activation in tumors." *Nature medicine* 16(12): 1421-1428.
- 62 Leibovich, B. C., Y. Sheinin, C. M. Lohse, R. H. Thompson, J. C. Cheville, J. Zavada and E. D. Kwon (2007). "Carbonic anhydrase IX is not an independent predictor of outcome for patients with clear cell renal cell carcinoma." *J Clin Oncol* 25(30): 4757-4764.
- 63 Leveridge, M. J., A. Finelli, J. R. Kachura, A. Evans, H. Chung, D. A. Shiff, K. Fernandes and M. A. Jewett (2011). "Outcomes of small renal mass needle core biopsy, nondiagnostic percutaneous biopsy, and the role of repeat biopsy." *European urology* 60(3): 578-584.
- 64 Li, G., J. Xu, Z. Wang, Y. Yuan, Y. Li, S. Cai and Y. He (2015). "Low expression of SOCS-1 and SOCS-3 is a poor prognostic indicator for gastric cancer patients." *Journal of cancer research and clinical oncology* 141(3): 443-452.
- 65 Lin, W. W. and M. Karin (2007). "A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer." *The Journal of clinical investigation* 117(5): 1175-1183.
- 66 Lipworth, L., R. E. Tarone and J. K. McLaughlin (2006). "The epidemiology of renal cell carcinoma." *J Urol* 176(6 Pt 1): 2353-2358.
- 67 Ljungberg, B., K. Bensalah, S. Canfield, S. Dabestani, F. Hofmann, M. Hora, M. A. Kuczyk, T. Lam, L. Marconi, A. S. Merseburger, P. Mulders, T. Powles, M. Staehler, A. Volpe and A. Bex (2015). "EAU guidelines on renal cell carcinoma: 2014 update." *European urology* 67(5): 913-924.
- 68 Lorenzo-Gomez, M. F., B. Padilla-Fernandez, P. Antunez-Plaza, F. J. Gracia-Criado, J. A. Miron-Canelo and J. M. Silva Abuin (2012). "Clinical profile and epidemiological changes of clear cell renal carcinoma during 12 years in our health area." *Arch Esp Urol* 65(9): 823-829.

- 69 Macleod, L. C., J. M. Hotaling, J. L. Wright, M. T. Davenport, J. L. Gore, J. Harper and E. White (2013). "Risk factors for renal cell carcinoma in the VITAL study." *J Urol* 190(5): 1657-1661.
- 70 Mandal, A., Y. Littler and G. Libertiny (2012). "Asymptomatic renal cell carcinoma with metastasis to the skin and duodenum: a case report and review of the literature." *BMJ Case Rep* 2012.
- 71 Masuda, A., T. Kamai, H. Abe, K. Arai and K. Yoshida (2009). "Is Stat3 and/or p53 mRNA expression a prognostic marker for renal cell carcinoma?" *Biomed Res* 30(3): 171-176.
- 72 Miki, S., M. Iwano, Y. Miki, M. Yamamoto, B. Tang, K. Yokokawa, T. Sonoda, T. Hirano and T. Kishimoto (1989). "Interleukin-6 (IL-6) functions as an in vitro autocrine growth factor in renal cell carcinomas." *FEBS Lett* 250(2): 607-610.
- 73 Milonas, D., G. Skulcius, R. Baltrimavicius, S. Auskalnis, M. Kincius, A. Matjosaitis, I. Gudnaviciene, G. Smailyte and M. Jievaltas (2013). "Comparison of long-term results after nephron-sparing surgery and radical nephrectomy in treating 4- to 7-cm renal cell carcinoma." *Medicina (Kaunas)* 49(5): 223-228.
- 74 Minegishi, Y., M. Saito, S. Tsuchiya, I. Tsuge, H. Takada, T. Hara, N. Kawamura, T. Ariga, S. Pasic, O. Stojkovic, A. Metin and H. Karasuyama (2007). "Dominant-negative mutations in the DNA-binding domain of STAT3 cause hyper-IgE syndrome." *Nature* 448(7157): 1058-1062.
- 75 Motzer, R. J., J. Bacik, B. A. Murphy, P. Russo and M. Mazumdar (2002). "Interferon-alfa as a comparative treatment for clinical trials of new therapies against advanced renal cell carcinoma." *J Clin Oncol* 20(1): 289-296.
- 76 Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn and H. Erlich (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1: 263-273.
- 77 Murakami, Y., K. Kanda, M. Tsuji, H. Kanayama and S. Kagawa (1999). "MN/CA9 gene expression as a potential biomarker in renal cell carcinoma." *BJU international* 83(7): 743-747.
- 78 Murray, P. J. (2007). "The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration." *Journal of immunology* 178(5): 2623-2629.
- 79 Nerich, V., M. Hugues, M. J. Paillard, L. Borowski, T. Nai, U. Stein, T. Nguyen Tan Hon, P. Montcuquet, T. Maurina, G. Mouillet, F. Kleinclauss, X. Pivot, S. Limat and A. Thierry-Vuillemin (2014). "Clinical impact of targeted therapies in patients with metastatic clear-cell renal cell carcinoma." *Onco Targets Ther* 7: 365-374.
- 80 Neuwirt, H., I. E. Eder, M. Puhr and M. Rudnicki (2013). "SOCS-3 is downregulated in progressive CKD patients and regulates proliferation in human

- renal proximal tubule cells in a STAT1/3 independent manner." *Lab Invest* 93(1): 123-134.
- 81 Ogata, H., T. Kobayashi, T. Chinen, H. Takaki, T. Sanada, Y. Minoda, K. Koga, G. Takaesu, Y. Maehara, M. Iida and A. Yoshimura (2006). "Deletion of the SOCS3 gene in liver parenchymal cells promotes hepatitis-induced hepatocarcinogenesis." *Gastroenterology* 131(1): 179-193.
  - 82 Palapattu, G. S., B. Kristo and J. Rajfer (2002). "Paraneoplastic syndromes in urologic malignancy: the many faces of renal cell carcinoma." *Rev Urol* 4(4): 163-170.
  - 83 Patard, J. J., P. Fergelot, P. I. Karakiewicz, T. Klatte, Q. D. Trinh, N. Rioux-Leclercq, J. W. Said, A. S. Belldegrun and A. J. Pantuck (2008). "Low CAIX expression and absence of VHL gene mutation are associated with tumor aggressiveness and poor survival of clear cell renal cell carcinoma." *Int J Cancer* 123(2): 395-400.
  - 84 Patard, J. J., E. Leray, N. Rioux-Leclercq, L. Cindolo, V. Ficarra, A. Zisman, A. De La Taille, J. Tostain, W. Artibani, C. C. Abbou, B. Lobel, F. Guille, D. K. Chopin, P. F. Mulders, C. G. Wood, D. A. Swanson, R. A. Figlin, A. S. Belldegrun and A. J. Pantuck (2005). "Prognostic value of histologic subtypes in renal cell carcinoma: a multicenter experience." *J Clin Oncol* 23(12): 2763-2771.
  - 85 Patard, J. J., E. Leray, A. Rodriguez, N. Rioux-Leclercq, F. Guille and B. Lobel (2003). "Correlation between symptom graduation, tumor characteristics and survival in renal cell carcinoma." *European urology* 44(2): 226-232.
  - 86 Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." *Nucleic Acids Res* 29(9): e45.
  - 87 Poprach, A., T. Pavlik, B. Melichar, K. Kubackova, Z. Bortlicek, M. Svoboda, R. Lakomy, R. Vyzula, I. Kiss, L. Dusek and T. Buchler (2013). "Clinical and laboratory prognostic factors in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with sunitinib and sorafenib after progression on cytokines." *Urol Oncol*.
  - 88 Quivy, A., A. Daste, A. Harbaoui, S. Duc, J. C. Bernhard, M. Gross-Goupil and A. Ravaud (2013). "Optimal management of renal cell carcinoma in the elderly: a review." *Clin Interv Aging* 8: 433-442.
  - 89 Renz-Polster, H., Krautzig, S. (Hrsg.): *Basislehrbuch Innere Medizin*. 4. Auflage. München: Urban & Fischer, 2008, S. 1006.
  - 90 Rossi, J. F., S. Negrier, N. D. James, I. Kocak, R. Hawkins, H. Davis, U. Prabhakar, X. Qin, P. Mulders and B. Berns (2010). "A phase I/II study of siltuximab (CNTO 328), an anti-interleukin-6 monoclonal antibody, in metastatic renal cell cancer." *Br J Cancer* 103(8): 1154-1162.
  - 91 Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis and H. A. Erlich (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." *Science* 239(4839): 487-491.

- 92 Sakurai, K., K. Muguruma, S. Yamazoe, K. Kimura, T. Toyokawa, R. Amano, N. Kubo, H. Tanaka, M. Yashiro, M. Ohira and K. Hirakawa (2014). "Gastric metastasis from renal cell carcinoma with gastrointestinal bleeding: a case report and review of the literature." *Int Surg* 99(1): 86-90.
- 93 Sandlund, J., E. Oosterwijk, K. Grankvist, J. Oosterwijk-Wakka, B. Ljungberg and T. Rasmuson (2007). "Prognostic impact of carbonic anhydrase IX expression in human renal cell carcinoma." *BJU international* 100(3): 556-560.
- 94 Schoppmann, S. F., B. Jesch, J. Friedrich, G. Jomrich, F. Maroske and P. Birner (2012). "Phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) correlates with Her-2 status, carbonic anhydrase 9 expression and prognosis in esophageal cancer." *Clin Exp Metastasis* 29(6): 615-624.
- 95 Sehgal, P. B. (2008). "Paradigm shifts in the cell biology of STAT signaling." *Semin Cell Dev Biol* 19(4): 329-340.
- 96 Shah, J. J., L. Feng, S. K. Thomas, Z. Berkova, D. M. Weber, M. Wang, M. H. Qazilbash, R. E. Champlin, T. R. Mendoza, C. Cleeland and R. Z. Orlowski (2016). "Siltuximab (CNTO 328) with lenalidomide, bortezomib and dexamethasone in newly-diagnosed, previously untreated multiple myeloma: an open-label phase I trial." *Blood Cancer J* 6: e396.
- 97 Siegel, R., D. Naishadham and A. Jemal (2013). "Cancer statistics, 2013." *CA Cancer J Clin* 63(1): 11-30.
- 98 Smaldone, M. C., A. T. Corcoran and R. G. Uzzo (2013). "Active surveillance of small renal masses." *Nat Rev Urol* 10(5): 266-274.
- 99 Song, D. Y., S. Song, Y. Song and J. E. Lee (2012). "Alcohol intake and renal cell cancer risk: a meta-analysis." *Br J Cancer* 106(11): 1881-1890.
- 100 Staehler, M., C. Tullmann, P. Nuhn, N. Haseke and C. G. Stief (2010). "[Systemic therapy of renal cell carcinoma]." *Urologe A* 49(12): 1543-1550; quiz 1551.
- 101 Steinman, R. A., A. Wentzel, Y. Lu, C. Stehle and J. R. Grandis (2003). "Activation of Stat3 by cell confluence reveals negative regulation of Stat3 by cdk2." *Oncogene* 22(23): 3608-3615.
- 102 Stofas, A., G. Levidou, C. Piperi, C. Adamopoulos, G. Dalagiorgou, A. Bamias, A. Karadimou, G. A. Lainakis, S. Papadoukakis, K. Stravodimos, M. A. Dimopoulos, E. Patsouris, H. Gakiopoulou and P. Korkolopoulou (2014). "The role of CXC-chemokine receptor CXCR2 and suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3) in renal cell carcinoma." *BMC Cancer* 14: 149.
- 103 Sutherland, K. D., F. Vaillant, W. S. Alexander, T. M. Wintermantel, N. C. Forrest, S. L. Holroyd, E. J. McManus, G. Schutz, C. J. Watson, L. A. Chodosh, G. J. Lindeman and J. E. Visvader (2006). "c-myc as a mediator of accelerated apoptosis and involution in mammary glands lacking Socs3." *EMBO J* 25(24): 5805-5815.



- 104 Takeda, K. and S. Akira (2000). "STAT family of transcription factors in cytokine-mediated biological responses." *Cytokine Growth Factor Rev* 11(3): 199-207.
- 105 Thoenes, W., S. Storkel and H. J. Rumpelt (1986). "Histopathology and classification of renal cell tumors (adenomas, oncocyomas and carcinomas). The basic cytological and histopathological elements and their use for diagnostics." *Pathol Res Pract* 181(2): 125-143.
- 106 Tomita, S., K. Ishibashi, K. Hashimoto, T. Sugino, T. Yanagida, N. Kushida, K. Shishido, K. Aikawa, Y. Sato, T. Suzutani and O. Yamaguchi (2011). "Suppression of SOCS3 increases susceptibility of renal cell carcinoma to interferon-alpha." *Cancer Sci* 102(1): 57-63.
- 107 Tsaor, I., D. Schilling and A. Haferkamp (2013). "[Active surveillance: concept for renal cell carcinoma?]." *Urologe A* 52(6): 793-799.
- 108 Tsui, K. H., O. Shvarts, R. B. Smith, R. Figlin, J. B. de Kernion and A. Belldegrun (2000). "Renal cell carcinoma: prognostic significance of incidentally detected tumors." *J Urol* 163(2): 426-430.
- 109 Uzzo, R. G. and A. C. Novick (2001). "Nephron sparing surgery for renal tumors: indications, techniques and outcomes." *J Urol* 166(1): 6-18.
- 110 Verger, E., M. Salamero and C. Conill (1992). "Can Karnofsky performance status be transformed to the Eastern Cooperative Oncology Group scoring scale and vice versa?" *Eur J Cancer* 28A(8-9): 1328-1330.
- 111 Villanueva-Gimeno, M. M., J. M. Vicario-Bermudez, C. Fonseca-Lopez, J. P. Caballero-Castro, S. I. Zabala-Lopez, M. A. Sanchez-Elipe and N. Gonzalez-Gomez (2013). "[Renal cell carcinoma producing erythrocytosis due to inappropriate production of erythropoietin]." *Semergen* 39(5): 282-284.
- 112 Walker, S. R., M. Xiang and D. A. Frank (2014). "STAT3 Activity and Function in Cancer: Modulation by STAT5 and miR-146b." *Cancers (Basel)* 6(2): 958-968.
- 113 Walsh, N., A. Larkin, S. Kennedy, L. Connolly, J. Ballot, W. Ooi, G. Gullo, J. Crown, M. Clynes and L. O'Driscoll (2009). "Expression of multidrug resistance markers ABCB1 (MDR-1/P-gp) and ABCC1 (MRP-1) in renal cell carcinoma." *BMC Urol* 9: 6.
- 114 Wan, J., Y. Che, N. Kang and W. Wu (2015). "SOCS3 blocks HIF-1alpha expression to inhibit proliferation and angiogenesis of human small cell lung cancer by downregulating activation of Akt, but not STAT3." *Mol Med Rep* 12(1): 83-92.
- 115 Wang, L., T. Yi, M. Kortylewski, D. M. Pardoll, D. Zeng and H. Yu (2009). "IL-17 can promote tumor growth through an IL-6-Stat3 signaling pathway." *J Exp Med* 206(7): 1457-1464.
- 116 Wang, T., G. Niu, M. Kortylewski, L. Burdelya, K. Shain, S. Zhang, R. Bhattacharya, D. Gabrilovich, R. Heller, D. Coppola, W. Dalton, R. Jove, D. Pardoll and H. Yu (2004). "Regulation of the innate and adaptive immune

responses by Stat-3 signaling in tumor cells." *Nature medicine* 10(1): 48-54.

- 117 Wilson, D., L. Hiller, L. Gray, M. Grainger, A. Stirling and N. James (2003). "The effect of biological effective dose on time to symptom progression in metastatic renal cell carcinoma." *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 15(7): 400-407.
- 118 Xu, F., S. Mukhopadhyay and P. B. Sehgal (2007). "Live cell imaging of interleukin-6-induced targeting of "transcription factor" STAT3 to sequestering endosomes in the cytoplasm." *Am J Physiol Cell Physiol* 293(4): C1374-1382.
- 119 Yoshimura, A. (2009). "Regulation of cytokine signaling by the SOCS and Spred family proteins." *Keio J Med* 58(2): 73-83.
- 120 Yoshimura, A., T. Naka and M. Kubo (2007). "SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation." *Nat Rev Immunol* 7(6): 454-465.
- 121 Yu, H. and R. Jove (2004). "The STATs of cancer--new molecular targets come of age." *Nat Rev Cancer* 4(2): 97-105.
- 122 Yu, H., D. Pardoll and R. Jove (2009). "STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3." *Nat Rev Cancer* 9(11): 798-809.
- 123 Zerati, M., K. R. Leite, J. Pontes-Junior, C. C. Segre, S. T. Reis, M. Srougi and M. F. Dall'Oglio (2013). "Carbonic Anhydrase IX is not a predictor of outcomes in non-metastatic clear cell renal cell carcinoma - a digital analysis of tissue microarray." *Int Braz J Urol* 39(4): 484-492.
- 124 Zhao, H., B. Ljungberg, K. Grankvist, T. Rasmuson, R. Tibshirani and J. D. Brooks (2006). "Gene expression profiling predicts survival in conventional renal cell carcinoma." *PLoS Med* 3(1): e13.

## 8. Anhang

### 8.1 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer an der Goethe-Universität Frankfurt am Main waren:

U. Abdel-Rahman, H. Ackermann, A. Allendorf, K. Badenhoop, H. Bader, P. Bader, W. Bechstein, S. Becker, M. Beeres, U. Benzenhöfer, C. Betz, K. Bochenneck, J. Bojunga, E. Boles, F. Bonzelius, J. Brand, R. Brandes, C. Brandt, H.-R. Brodt, B. Brüne, G. Bug, H. Buxmann, E. Chavakis, N. Dauth, F. Dehghani, T. Deller, M. Diensthuber, D. Dunsch, J. Ehrlich, O. Eickmeier, A. El Saman, E. Endemann, A. Esmacili, X. Esser, S. Fichtlscherer, C. Fiegel, D. Fischer, C. Foerch, F. Fornoff, J. Frank, H. Galonska, H. Geiger, F. Gerlach, J. Groneberg, T. Gruber-Rouh, N. Habbe, A. Haferkamp, R. Hammerstingl, L.-O. Hattenbach, I. Hauser, F. Heringer, S. Heyl, M. Hoffmann, K. Holzer, I. Hrgovic, P. Jacobi, J. Kaiser, R. Kaufmann, M. Keese, C. Kell, M. Kieslich, M. Kirwil, O. Klein, T. Klingebiel, T. Kohnen, H. Korf, M. Leiblein, E. Lindhoff-Last, F. Louwen, T. Lustenberger, P. Malkomes, W. Mäntele, V. Marcu, S. Marinos, E. Maronde, G. Marquardt, I. Marzi, S. Meier, J. Mersmann, A. Meurer, A. Moritz, M. Müller, C. Nau, F. Nürnberger, N. Obermüller, F. Ochsendorf, H. Oelschläger, U. Paetow, N. Papadopoulos, A. Pape, J. Pfeilschifter, W. Pfeilschifter, R. Püllen, M. Rauschmann, A. Reinisch, J. Roeper, U. Rolle, M. Rosewich, U. Rüb, M. Rüsseler, R. Sader, A. Sander, N. Sängler, R. Schlößer, T. Schmitz-Rixen, B. Schnappauf, A. Schnitzbauer, M. Schöffauer, C. Schomerus, T. Schreckenbach, J. Schulze, D. Schwabe, S. Schwarzacher, F. Seeger, V. Seifert, H. Serve, B. Steffen, J. Stehle, H. Steinmetz, R. Stolte, P. Störmann, T. Stöver, T.-M. Theilen, J. Trojan, I. Tsaur, A. Urbschat, E. Valesky, G. Vetter, T. Vogl, F. Walcher, H. Wicht, B. Wittekindt, G. Woeste, T. Wolf, S. Wutzler, H. Wyen, K. Zacharowski, F. Zanella, M. Zeiher, S. Zeuzem, S. Zielen, K. Zwicker.

## 8.2 Förderung und Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Rainer Hofmann, Direktor der Klinik für Urologie und Kinderurologie der Universitätsklinik Marburg, der mich als Doktorandin herzlich aufgenommen hat.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau PD Dr. med. Anja Urbschat für die Bereitstellung des Promotionsthemas, Finanzierung der Arbeit sowie für die kontinuierliche, stets hilfreiche und engagierte, den üblichen Rahmen übertreffende Betreuung bedanken.

Auch für die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens möchte ich mich herzlich bedanken.

Des Weiteren möchte ich einen Dank an Herrn Prof. Dr. med. Axel Hegele, Herrn PD Dr. rer. nat. Jörg Hänze und Kati Oplesch mit der gesamten Arbeitsgruppe für die Bereitstellung der Ressourcen des Urologischen Forschungslabors an der Universitätsklinik Marburg sowie für die fachliche und freundliche Unterstützung und Beratung aussprechen.

Ebenfalls gilt mein Dank Herrn PD Dr. rer. nat. Malte Bachmann für die guten Ratschläge und ständige Diskussionsbereitschaft.

Ich möchte an dieser Stelle auch meiner gesamten Familie für die Unterstützung während meines Studiums und während der Fertigstellung dieser Arbeit danken.